Б. Н. ТАРУСОВ, В. Ф. АНТОНОВ, Е. В. БУРЛАКОВА,
К. С. БУРДИН, Ю. П. КОЗЛОВ, О. Р. КОЛЬС,
Ю. А. КРИГЕР, Ю. Б. КУДРЯШОВ, Г. А. КУРЕЛЛА,
Ф. Ф. ЛИТВИН, Т. Г. МАМЕДОВ, И. М. ПАРХОМЕНКО,
Ю. М. ПЕТРУСЕВИЧ, Л. Г. ЯГЛОВА

Биофизика

Под редакцией
Б. Н. Тарусова и О. Р. Кольс

Допущено
Министерством высшего и среднего
специального образования СССР
в качестве учебного пособия
для студентов биологических специальностей
университетов



ИЗДАТЕЛЬСТВО «ВЫСШАЯ ШКОЛА»
Москва — 1968

Цель настоящей книги — ознакомить читателей с основными проблемами и современным состоянием биофизики.

Роль биофизики в ряду биологических дисциплин непрерывно возрастает и непрерывно увеличивается круг вопросов, которые должны решаться именно биофизикой. Однако еще существует тенденция подходить к биофизике формально и считать, что ее задача ограничивается применением физических методов исследования в биологии. Это совершенно неправильно, так как основная задача биофизики — вскрытие физических и, главным образом, физико-химических механизмов, лежащих в основе функционирования живого организма.

В настоящей книге определена специфика биофизики как науки и обрисован круг проблем, над которыми работают биофизики в настоящее время. Являясь учебным пособием, книга дает студентам и аспирантам биологам и медикам — на которых она главным образом и рассчитана, основные знания предмета, необходимые для перехода к более углубленному изучению биофизики. В книге не рассматриваются подробно вопросы биофизики макромолекул — белков и нуклеиновых кислот, поскольку эти вопросы уже нашли свое отражение в ряде монографий по молекулярной биологии.

Книга написана коллективом авторов — преподавателей и научных сотрудников кафедры биофизики Биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, на которой впервые в Советском Союзе в 1953 г. было начато преподавание биофизики, как самостоятельной дисциплины.

2-10-2
142-68

ПРЕДИСЛОВИЕ

За последнее десятилетие биофизика вошла как самостоятельный предмет в цикл дисциплин, которые преподаются на биологических и биолого-почвенных факультетах университетов. Настоящее руководство написано группой преподавателей кафедры биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Книга рассчитана на студентов всех биологических специальностей, изучающих эту дисциплину на третьем и четвертом курсах, т. е. уже знакомых с такими предметами как физиология, биохимия, физика и, особенно, физическая химия. Это руководство еще нельзя считать учебником по биофизике, хотя оно по построению соответствует программе по общей биофизике, утвержденной Министерством высшего и среднего специального образования СССР. Данное руководство может быть использовано также и студентами медицинских и сельскохозяйственных вузов, в которых ведется преподавание биофизики.

Отдельные главы настоящего руководства написаны следующими авторами:

Введение —«Биофизика, ее задачи и проблемы»— Б. Н. Тарусовым;

Глава I —«Термодинамика биологических систем»— В. Ф. Антоновым;

Глава II —«Кинетика биологических реакций»— И. М. Пархоменко;

Глава III —«Свободно-радикальные процессы в биологических системах»— Ю. П. Козловым;

Глава IV —«Полимерная природа протоплазмы»— Ю. П. Козловым;

Глава V —«Проницаемость клеток и тканей»— Ю. А. Кригером;

Глава VI —«Электропроводность биологических систем»— Л. Г. Ягловой;

Глава VII —«Физико-химические основы возбуждения»— О. Р. Кольс;

Глава VIII —«Биоэлектрические потенциалы»— Г. А. Курелла;

Глава IX —«Электрокинетические явления»— Ю. Б. Кудряшовым;

Глава X —«Мышечное сокращение»— Б. Н. Тарусовым;

Глава XI —«Биофизические механизмы фотобиологических процессов»— Ф. Ф. Литвиным;

Глава XII — «Ионизирующие излучения». I — «Физика ионизирующих излучений»— К. С. Бурдиным, Ю. М. Петрусевичем; II —«Биологическое действие ионизирующих излучений»— Е. В. Бурлаковой;

Глава XIII —«Клеточное деление»— Т. Г. Мамедовым;

Глава XIV —«Авторегулирование»— Б. Н. Тарусовым.

ВВЕДЕНИЕ

БИОФИЗИКА, ЕЕ ЗАДАЧИ И ПРОБЛЕМЫ

В познании свойств живой материи в последнее время все бóльшую и бóльшую роль играют химия и физика. В конце XIX века развитие органической химии привело к возникновению биохимии, которая сформировалась в самостоятельную науку, достигшую в настоящее время высокого уровня развития.

Труднее проникала в биологию физика. Еще в прошлом столетии, по мере развития физики, делались многочисленные попытки использовать ее методы и теории для изучения и понимания природы биологических явлений. При этом на живые ткани и клетки смотрели как на физические системы и не учитывали того, что основную определяющую роль в этих системах играет химия. Именно поэтому попытки подойти к биологическим объектам с чисто физических позиций носили наивный характер.

Основным методом этого направления являлись поиски аналогий.

Биологические явления, сходные внешне с явлениями чисто физическими, трактовались, соответственно, как физические. Например эффект мышечного сокращения объясняли пьезоэлектрическим механизмом на основании того, что при наложении потенциала на кристаллы происходило изменение их длины. На рост клеток смотрели как на явление, вполне аналогичное росту кристаллов. Клеточное деление рассматривали как явление, обусловленное лишь поверхностно активными свойствами наружных слоев протоплазмы. Амебоидное движение клеток рассматривали как результат изменения их поверхностного натяжения и, соответственно, моделировали движением ртутной капли в растворе кислоты.

Даже значительно позже, в двадцатых годах нашего столетия, детально рассматривали и изучали модель нервного проведения, так называемую модель Лилли, представлявшую собой железную проволоку, которая погружалась в раствор кислоты и покрывалась при этом пленкой окиси. При нанесении на поверхность царапины окись разрушалась, а затем восстанавливалась, но одновременно разрушалась в соседнем участке и т. д. Другими словами, получилось распространение волны разрушения и восстановления, очень похожее на распространение волны электроотрицательности при раздражении нерва.

Возникновение квантовой теории привело к попытке объяснить действие лучистой энергии на биологические объекты с позиций статической физики. Появилась формальная теория, которая объясняла лучевое поражение как результат случайных попаданий кванта (или ядерной частицы) в особо уязвимые клеточные структуры. При этом совершенно упускались из виду те конкретные фотохимические и последующие химические процессы, которые определяют развитие лучевого поражения во времени.

Еще недавно на основании формального сходства закономерностей электропроводности живых тканей и электропроводности полупроводников пытались применить теорию полупроводников для объяснения структурных особенностей целых клеток.

В настоящее время разрабатываются модели, которые в какой-то мере воспроизводят поведение целых живых организмов. Так были созданы электронная мышь и электронная черепаха. Они действительно выполняют некоторые акты, присущие живым организмам. Но механизмы, лежащие в основе их работы, отличны от механизмов процессов жизнедеятельности. Познавательное значение подобных моделей для биофизики ограничено.

В общем, надо отметить, что направление, базирующееся на моделях и аналогиях, хотя и может привлечь к работе весьма совершенный математический аппарат, вряд ли приблизит биологов к пониманию сущности биологических процессов. Попытки использования чисто физических представлений для понимания жизненных явлений и природы живой материи дали большое количество спекулятивных теорий и ясно показали, что прямой путь физики в биологию не продуктивен, так как живые организмы стоят несравненно ближе к химическим системам, чем к физическим.

Значительно более плодотворным оказалось внедрение физики в химию. Применение физических представлений сыграло большую роль в понимании механизмов химических процессов. Возникновение физической химии сыграло в химии революционную роль. На основе тесного контакта физики и химии возникли современная химическая кинетика и химия полимеров. Некоторые разделы физической химии, в которых физика получила доминирующее значение, стали называться химической физикой.

Необходимость возникновения физической химии и химической физики диктовалась тем, что к концу XIX в. химия накопила огромный фактический материал. Стали известны десятки тысяч разнообразных соединений, и поэтому возникла необходимость установить общие закономерности, которые показала бы связь строения молекул с их реактивной способностью. Такую связь можно установить только при помощи физики.

Именно с возникновением физической химии связано развитие биофизики. Многие важные для биологии представления пришли в нее из физической, химии. Например, появление в физической

химии теории растворов и установление факта, что соли в водных растворах распадаются на ионы, привело к представлению о важной роли ионов в основных процессах жизнедеятельности.

Было установлено, что в явлениях возбуждения и проведения решающая роль принадлежит именно ионам. Так возникли ионные теории возбуждения, разработанные Нернстом (W. Nernst) и П. П. Лазаревым.

С успехами коллоидной химии связаны исследования, в которых было показано, что в основе повреждения протоплазмы различными факторами лежит коагуляция биоколлоидов. В связи с возникновением учения о полимерах коллоидная химия протоплазмы переросла в биофизику полимеров и, особенно, полиэлектролитов.

Появление химической кинетики также вызвало появление аналогичного направления в биологии. Еще Аррениус (S. V. Arrenius) — один из основателей химической кинетики, показал, что общие закономерности химической кинетики применимы к изучению кинетических закономерностей в живых организмах и к отдельным биохимическим реакциям.

Успехи применения физической и коллоидной химии при объяснении ряда биологических явлений нашли отражение и в медицине. Была выявлена роль ионных и коллоидных явлений в воспалительном процессе. Физико-химическую интерпретацию получили закономерности клеточной проницаемости и ее изменений при патологических процессах. Таким образом открылась новая глава патологии — физико-химическая патология.

Новое направление в биологии, базирующееся на физике и физической химии, стали называть физико-химической биологией, биологической физико-химией, биофизической химией. Позже все эти термины были объединены одним термином — биофизика. По существу *биофизика — это физическая химия и химическая физика биологических систем.*

ИЗ ИСТОРИИ РАЗВИТИЯ БИОФИЗИКИ

Биофизика как наука начала формироваться еще в XIX в. Многие физиологи того периода уже работали над вопросами, которые в настоящее время являются объектом биофизического исследования. Так например выдающийся физиолог И. М. Сеченов являлся пионером в этой области. Используя методы физической химии и математический аппарат, он изучал динамику дыхательного процесса и установил при этом количественные законы растворимости газов в биологических жидкостях. Он же предложил называть область подобного рода исследований молекулярной физиологией. В этот же период известный физик Гельмгольц (H. Helmholz), разрабатывая проблемы термодинамики, пытался подойти к пониманию энергетики живых систем. В своей экспериментальной работе он детально изучал работу органов зрения, а также определил скорость проведения возбуждения по нерву.

С развитием физической и коллоидной химии фронт работ в области биофизики расширяется. Появляются попытки объяснить с этих позиций механизм реакций живого организма на внешние воздействия. Большую роль в развитии биофизики сыграла школа Лёба (J. Loeb). В работах Лёба были выявлены физико-химические основы явления партеногенеза и оплодотворения. Конкретную физико-химическую интерпретацию получило явление антагонизма ионов. Обобщающая книга Лёба «Динамика живого вещества» была издана на многих языках. В 1906 г. перевод этой книги был издан в России. Позднее появились классические исследования Шаде (H. Schade) о роли ионных и коллоидных процессов в патологии воспаления. В 1911—1912 гг. в русском переводе выходит его фундаментальный труд «Физическая химия во внутренней медицине».

Первая мировая война приостановила на некоторое время бурное развитие науки. Однако в России уже в первые годы после Великой Октябрьской революции развитию науки уделяется большое внимание. В 1922 г. в СССР открывается «Институт биофизики», которым руководит П. П. Лазарев. В этом институте ему удается объединить большое количество выдающихся ученых. Здесь С. И. Вавилов занимался вопросами предельной чувствительности человеческого глаза, П. А. Ребиндер и В. В. Ефимов изучали физико-химические механизмы проницаемости и связь между проницаемостью и поверхностным натяжением, С. В. Кравков изучал физико-химические основы цветного зрения и т. д. Большую роль в развитии биофизики в Советском Союзе сыграла школа Н. К. Кольцова. Его ученики широко разрабатывали вопросы влияния физико-химических факторов внешней среды на клетки и их структуры. По инициативе Н. К. Кольцова, в Московском университете была открыта кафедра физико-химической биологии, руководимая его учеником С. Н. Скадовским.

В конце 30-х годов физико-химическое направление в биологии развивалось в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР. Во Всесоюзном институте экспериментальной медицины им. А. М. Горького существовал большой Отдел биофизики, в котором работали П. П. Лазарев, Г. М. Франк, Д. Л. Рубинштейн; последним был написан ряд учебных руководств и монографий.

В начале 50-х г. г. был организован Институт биологической физики в АН СССР и кафедра биофизики на Биолого-почвенном факультете МГУ. Позднее кафедры биофизики были созданы в Ленинградском и некоторых других университетах.

Характерной чертой биофизики, отличающей ее от биохимии, является то, что она рассматривает целостные системы, не разлагая их по возможности на отдельные химические компоненты. Биофизик всегда должен иметь в виду, что элементарные жизненные процессы протекают в сложных высокополимерных комплексах. При выделении же в чистом виде отдельных компонентов утрачиваются, как правило, важнейшие свойства живого. Нормально функционировать биополимеры способны только в условиях ненарушенной живой системы.

Поэтому перед биофизикой встает задача получения информации о физико-химическом строении клетки и ее биополимеров именно в таком виде, в котором они существуют при жизни. Получение же сведений от живой функционирующей системы требует применения таких физических методов и в таких условиях, при которых они сами не вносят каких-либо изменений в иссле-

дуемую систему. Между тем многие применяемые в экспериментальной биологии воздействия производят в живых системах необратимые изменения. Например, изменения температуры, различные растворители, соли, кислоты и т. п. приводят к разрушению высокополимерных комплексов, хотя внешняя форма клетки и ее органоидов при этом может сохраняться.

О нарушении жизненных процессов можно прежде всего судить по изменению физических параметров, характерных для живых клеток. При всех вышеупомянутых воздействиях клетки теряют, например, способность к поляризации. Это говорит о том, что физико-химические свойства, характерные для живой клетки, существенно меняются при повреждении. Кроме того, при различных воздействиях на клетку могут возникать и артефакты — образовываться структуры и соединения, которых нет в неповрежденных клетках. В этом отношении критического подхода требует, например, электронная микроскопия, являющаяся мощным познавательным средством для биологии. С ее помощью цитология и вирусология сильно расширили свои горизонты. Однако, когда при помощи только электронной микроскопии пытаются вскрыть детали тонкого молекулярного строения живого вещества, исследователи иногда сталкиваются с артефактами, что может приводить к ошибочным выводам.

Большая сложность и высокая лабильность живых объектов ставит биофизика в трудные условия и вынуждает его перерабатывать физические методы, создавая специализированные биофизические методы и приемы. Стремление изучать по возможности ненарушенную или лишь минимально измененную живую систему вынуждает биофизиков пользоваться очень слабыми источниками излучения при исследовании оптических свойств клеток, слабыми электрическими токами при измерении электрических параметров и т. п. Поэтому же в своих исследованиях биофизики должны широко использовать усилительную технику.

За последнее время четко выявился ряд теоретических и практических проблем, которые могут и должны решаться именно биофизикой. Биофизика занимается, в первую очередь, вопросами размена энергии в биологическом субстрате, исследованием роли субмикроскопических и физико-химических структур в жизнедеятельности клеток и тканей, возникновением возбуждения и происхождением биоэлектрических потенциалов, вопросами авторегуляции физико-химических процессов в живых организмах. Конкретные задачи современной биофизики весьма разнообразны.

Одна из основных задач биофизики — выявление физических и физико-химических параметров, характерных для живых объектов. Известно, что характерным свойством живых клеток является наличие электрического потенциала между клеткой и окружающей средой; способность удерживать ионный градиент по калию и натрию между клеткой и средой; способность поляризовать

электрический ток. При гибели живого объекта эти свойства исчезают. В зафиксированных гистологических препаратах выявляются надмолекулярные структуры, отсутствующие в живых неповрежденных клетках. В то же время тонкие молекулярные структуры клетки, обеспечивающие ее основные прижизненные свойства, оказываются нарушенными. Поэтому именно вопрос о выявлении истинных молекулярных структур и определение прижизненных физико-химических параметров биологических объектов приобретает огромное значение.

Одним из важнейших направлений биофизики является изучение биологического действия ионизирующих излучений. Эта проблема разносторонне изучается различными дисциплинами (физиологией, биохимией, патологией и др.), но самая существенная роль отводится здесь биофизике. Важнейшим моментом в действии лучистой энергии на биологический субстрат является первичный переход физической энергии, поглощенной биологическим субстратом, в химическую энергию и развитие первичных химических реакций. При этом происходит образование высокоактивных радикалов и ионов, которые и служат центрами первичных реакций. Первичный выход активных химических продуктов определяет все дальнейшее развитие лучевого поражения. Поэтому в настоящее время первостепенное значение приобретает исследование химической природы первичных радикалов и кинетики радикальных реакций. Отсюда вытекает и важная задача торможения радиационно-химических реакций различными ингибиторами природного происхождения.

Ослабление радиационного эффекта — вполне реальная задача. При введении в организм перед облучением некоторых веществ-ингибиторов осуществляется так называемая химическая защита. Биофизика выявляет физико-химические свойства молекул веществ-ингибиторов и на основе общих принципов дает методы подбора необходимых соединений.

Вопрос размена и передачи энергии при фотохимических процессах стоит в основе другой важной биофизической проблемы — проблемы механизма фотосинтеза. С этой проблемой связан также еще один принципиальный для биофизики вопрос: вопрос о возможности миграции энергии и о механизме такой миграции. Есть основания полагать, что химическая реакция при фотосинтезе протекает не в том месте, где осуществляется первичный процесс взаимодействия квантов света с веществом, а на некотором расстоянии, т. е. там, куда переносится поглощенная энергия.

В таком же аспекте изучаются биофизикой первичные механизмы, лежащие в основе зрительного акта, исследуются продукты фотохимических реакций, происходящих при поглощении энергии света пигментами зрительных рецепторов.

Следующим важным направлением биофизики является исследование проницаемости клеток и тканей. Физико-химическая

биология уже давно занимается выявлением закономерностей проникновения вещества в живые клетки. Это практически важный вопрос, так как с проницаемостью связано фармакологическое действие лекарственных веществ и токсическое действие различных ядов. Проникновение веществ в клетки зависит в первую очередь от физико-химических свойств молекул, их растворимости, их электрических свойств — распределения зарядов. Биофизика должна установить коррелятивную связь между этими свойствами вещества и его способностью проникать в клетки. С другой стороны, проницаемость связана со способностью поверхностных клеточных мембран пропускать те или иные вещества. Поэтому биофизика изучает и физико-химические свойства биологических мембран и способы повышения или понижения проницаемости действием различных агентов. Последнее имеет большое значение для лечебных мероприятий, для применения ядовитых инсектицидов в сельском хозяйстве, при дезинфекции и т. п.

Протоплазма клеток состоит из высокополимерных веществ, в основном полиэлектролитов, и обладает свойствами, присущими этому классу соединений. Углубленные исследования в этой области открывают новые возможности для изучения свойств протоплазмы. В частности, в настоящее время уже удалось значительно приблизиться к пониманию вопроса об избирательном поглощении калия живыми клетками.

Изучение физико-химических превращений биополимеров в клетке тесно связано с выявлением механизма возникновения возбуждения и биоэлектрических потенциалов как в недифференцированных клетках, так и в специализированных нервных и мышечных элементах. Физиология уже давно использует биоэлектрические потенциалы для оценки физиологических и патологических состояний организма. Перед биофизикой стоит другая большая задача — выявить физико-химические причины появления и развития биоэлектрических потенциалов, определить их энергетические источники и этим открыть путь для бóлее глубокого анализа физико-химического состояния клеток в норме и патологии.

Биофизика вместе с другими дисциплинами принимает сейчас участие в расшифровке важнейших вопросов о физико-химических механизмах передачи наследственных свойств и изучает механизмы, определяющие устойчивость вида и его изменчивость. При этом анализируются те силы, которые вызывают деление и расхождение хромосом, физико-химические основы взаимодействия нуклеиновых кислот, физико-химическая природа гена и т. д.

Наконец, в настоящее время большое внимание биофизики привлекает проблема авторегуляции. В изучении авторегуляции заинтересована не только биология, но и техника, так как некоторые механизмы авторегулирования, существующие у живых организмов, могут послужить источником новых идей для различных областей техники. Действительно, в биологических системах

существуют весьма совершенные механизмы для регулирования химических реакций, лежащих в основе энергетического обмена веществ. В клетках с удивительным постоянством поддерживаются величины pH и ионный баланс калия и натрия даже при значительных изменениях концентрации во внешней среде. Биологические системы очень хорошо координируют уровни протекания энергетических процессов. При этом, несмотря на высокую лабильность и способность реагировать на незначительные изменения во внешней среде, биологические системы обладают высокой надежностью. Авторегулирующие механизмы играют большую роль в приспособлении животных и растений к изменяющимся условиям внешней среды. Для понимания вопросов авторегулирования требуется разработка термодинамики и кинетики биологических процессов, что и составляет важнейшую задачу биофизики.

Подводя итоги, можно сказать, что для решения перечисленных выше вопросов необходимо получать информацию о физико-химических процессах в живом субстрате. Это может быть осуществлено только методами биофизики, и в этом направлении уже сделаны существенные шаги.

ГЛАВА I

ТЕРМОДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Термодинамика — наука о превращении энергии. Само существование живого организма и все процессы жизнедеятельности в нем тесно связаны с изменением энергетического баланса в системе «живой организм — окружающая среда», поэтому термодинамические методы широко используются в биологии.

Термодинамические методы в основе своей являются методами статистическими. Нельзя представить себе, например, температуру или давление одной какой-либо молекулы, потому что эти термодинамические параметры отражают взаимодействие огромного количества молекул, образующих макросистему. Термодинамика не дает ответа на вопрос — какова природа или механизм того или иного явления. Она может только показать, возможно ли протекание данного процесса, реален ли он с точки зрения энергетики. И это очень важно для биологии. С термодинамикой тесно связана и теория информации, нашедшая в настоящее время широкое применение при изучении биологических систем. Однако критерием для суждения о механизме процессов, протекающих в живом организме, остается биологический эксперимент.

В настоящее время вырисовываются два наиболее перспективных направления использования термодинамики в биологии. Это во-первых, расчеты энергетических превращений в живом организме и в отдельных системах и органах в покое и при совершении работы (например, при мышечном сокращении, проведении нервных импульсов, осмотической работе); определение коэффициента полезного действия биологических процессов и энергии связи биохимических соединений. Во-вторых, исследование живых организмов как открытых термодинамических систем, позволяющее подойти к изучению таких процессов, как например, активный и пассивный транспорт веществ через клеточные мембраны и возникновение биоэлектрических потенциалов.

ТЕРМИНОЛОГИЯ

Система. Всякий материальный объект, всякое тело, состоящее из большого числа частиц, называется термодинамической системой. Размеры системы, следовательно, всегда значительно больше размеров составляющих ее частиц.

Термодинамика рассматривает три типа систем, различающихся характером взаимодействия их с окружающей средой. Изолированной называется такая система, которая не обменивается с окружающей средой ни веществом, ни энергией. Замкнутой называется система, обменивающаяся с окружающей средой энергией, но обмена веществом через границы системы при этом не не происходит. *Изолированные и замкнутые системы относятся к закрытым системам.* Открытой системой называется такая система, которая обменивается с окружающей средой и энергией и веществом. С точки зрения термодинамики *живой организм относится к открытым системам.*

Термодинамические функции. Совокупность физических и химических свойств системы определяет состояние, которое можно описать с помощью термодинамических функций: температуры, давления, объема, энергии, энтропии и др. *Термодинамические функции, которые зависят от массы или количества микрочастиц в системе, называются экстенсивными, или факторами емкости (объем, энергия, энтропия). Термодинамические параметры, которые не* энергия, энтропия). Термодинамические параметры, которые не *зависят от массы или числа частиц в системе, называются интенсивными параметрами, или факторами потенциала (давление, температура, скорость изменения энтропии).*

Энергия. Энергия — это мера определенной формы движения материи при ее превращении из одной формы в другую. Энергия отражает способность системы производить работу. На основании всего опыта изучения природы физика пришла к установлению постулата — закона сохранения энергии, по которому энергия не создается из ничего и не может превратиться в ничто; если в ходе процесса исчезает энергия одного вида, то взамен появляется энергия другого вида.

Формально энергию можно определять как произведение фактора интенсивности на фактор экстенсивности, или фактора потенциала на фактор емкости. Например, механическая энергия выражается как PV (P — давление, V — объем); тепловая — TS (T — температура, S — энтропия), химическая μm (μ — химический потенциал, m — масса); электрическая EI (E — напряжение, I — сила тока).

Термодинамическое равновесие — состояние системы, при котором способность производить работу равна нулю и из которого она не может выйти без затраты энергии извне.

ПЕРВЫЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ В БИОЛОГИИ

Первый закон термодинамики гласит: *работа, совершаемая системой, равна разности между количеством теплоты, сообщаемой системе, и изменением ее внутренней энергии*

$$\Delta A = \Delta Q - \Delta U; \qquad (1.1)$$
$$\Delta Q = \Delta U + \Delta A,$$

где ΔA — количество совершенной работы,

ΔQ — количество подведенного тепла,

ΔU — изменение внутренней энергии.

В количественной форме первый закон термодинамики отражает закон сохранения энергии. Таким образом, первый закон термодинамики вводит понятие внутренней энергии как суммы энергии всех видов движения и взаимодействия входящих в систему частиц энергии поступательного и вращательного движения молекул и колебательного движения атомов, энергии молекулярного взаимодействия, внутриядерной энергии и т. д.

Из первого закона следует, что работа может совершаться или за счет изменения внутренней энергии системы или за счет сообщения системе некоторого количества тепла.

В живой системе, независимо от того, целый это организм или отдельные органы (например, мышцы), работа не может совершаться за счет притока тепла извне, т. е. живой организм не может работать, как тепловая машина. Это можно проиллюстрировать простым примером. Известно, что коэффициент полезного действия тепловой машины определяется по формуле

$$\text{к. п. д.} = \frac{T_1 - T_2}{T_1}, \qquad (1.2)$$

где T_1 и T_2 — температуры источника тепла и холодильника в абсолютной шкале температур.

Попытаемся определить температуру мышцы, (T_1), предполагая, что она работает как тепловая машина при температуре $+25°$ C с к. п. д. $= 30\%$. В °K $T_2 = 298°$ $(25 + 273 = 298)$. Подставляя в формулу (1. 2) температуру холодильника (T_2) в °K и к. п. д. $\approx \approx \frac{1}{3}$, получим:

$$\frac{T_1 - 298}{T_1} = \frac{1}{3}; \quad T_1 = 447°\,\text{K} \quad \text{или} \quad +174°\,\text{C}.$$

Таким образом, если бы мышца работала, как тепловая машина, она нагрелась бы в этих условиях до температуры $+174°$ C. Это, разумеется, нереально, так как белки, как известно, денатурируются при температуре 40—60° C.

Таким образом, в живом организме работа совершается за счет изменения внутренней энергии системы при различного рода биохимических процессах или за счет изменения энтропийного фактора (об энтропии см. стр. 20).

Первые попытки доказательства справедливости первого закона термодинамики для биологии были предприняты еще в XVIII в. и заключались в том, что живой организм изолировали от окружающей среды, измеряли количество выделенного им тепла и сравнивали эту величину с тепловым эффектом биохимических реакций внутри организма. С этой целью в 1780 г. Лавуазье и Лаплас помещали морскую свинку в ледяной калориметр и измеряли количе-

ство выделенного тепла и CO_2. После этого определяли количество тепла, выделяющееся при прямом сжигании до CO_2 исходных продуктов питания. В обоих опытах были получены величины близкого порядка, что указывало на полную эквивалентность химической энергии, освобождающейся в организме в ходе обмена веществ, и тепловой энергии, выделяемой организмом во внешнюю среду.

Метод Лавуазье и Лапласа, получивший название метода непрямой калориметрии, основывается на том факте, что нормальное потребление O_2 и выделение CO_2 в организме теплокровного животного тесно коррелируется с теплопродукцией. Для иллюстрации можно рассмотреть пример окисления углеводов:

$$\underset{(180\ г)}{C_6H_{12}O_6} + \underset{(134,4\ л)}{6O_2} = 6CO_2 + 6H_2O + 678\ \textit{ккал}.$$

Уравнение показывает, что утилизация шести молей O_2 (1 моль газа занимает объем 22,4 *л*) или образование шести молей CO_2 при окислении 1 моля глюкозы (180 *г*) сопровождается выделением 678 *ккал* тепла. Следовательно, потребление 1 *л* O_2 или выделение 1 *л* CO_2 сопровождается выделением 5,047 *ккал* тепла (678:134,4).

Таким образом, тепловыделение в организме любого животного может быть рассчитано умножением потребленного количества O_2 или выделенного количества CO_2 на 5,047 *ккал*.

Более точные результаты были получены в 1904 г. Этуотером, использовавшим для опытов метод прямой калориметрии в специально сконструированной камере (рис. 1).

В ходе опыта измеряли выделяемое человеком тепло, количество поглощенного кислорода, количество выделенной углекислоты, азота и мочевины. На основании полученных данных вычисляли баланс обмена белков, жиров и углеводов. При этом учитывали, что полное окисление 1 *г* жира до углекислого газа и воды дает 9,3 *ккал*; 1 *г* смешанных углеводов — 4,2 *ккал*; окисление 1 *г* белка до мочевины, как это имеет место в организме — 4,2 *ккал*. Рассчитанное на основании этих данных количество тепла и количество тепла, измеренное в опыте, совпали с точностью до 1%.

Тепловой баланс человека за сутки (*в ккал*)

Приход		*Расход*	
Питательные вещества		Выделенная теплота	1374
56,8 *г* белка . .	237	Выпускаемые газы	43
140,0 *г* жира . .	1307	Кал и моча	23
79,9 *г* углеводов	335	Испарение через дыхание	181
		Испарение через кожу	227
		Различные поправки	11
Всего	1879	Всего	1859

Следует отметить, что приведенные расчеты показывают хорошее совпадение в том случае, если организм не производит значительной работы и в нем не происходит значительного накопления массы, т. е. роста.

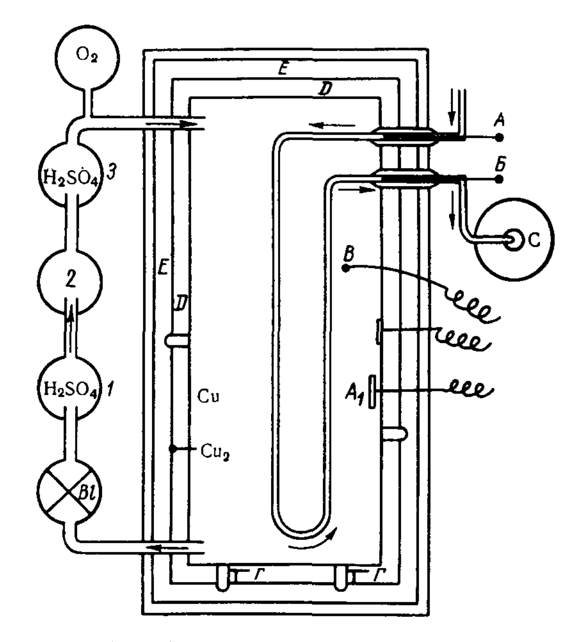


Рис. 1. Схема прибора Этуотера:

1, *3* — H_2SO_4 для поглощения выдыхаемой влаги, *2* — натронная известь для поглощения выдыхаемой CO_2, O_2 — источник кислорода, *C* — источник воды, циркулирующей в приборе, *Bl* — насос, *A*, A_1, *Б*. *В*, *Г* — термометры, Cu и Cu_2 — двойная медная стенка, *E*, *D* изолирующая прослойка воздуха

В настоящее время известно, что теплота, выделенная в данный момент времени организмом, может быть условно разделена на первичную (основную) теплоту и вторичную (активную) теплоту. Первичная теплота возникает как результат неизбежного теплового рассеивания энергии в ходе обмена веществ из-за необратимо протекающих биохимических реакций. Выделение этого тепла происходит сразу же после поглощения организмом кислорода и продуктов питания.

Вторичная теплота выделяется лишь при активной работе, совершаемой организмом, когда запасенные ранее богатые энергией соединения реализуются в ходе активного процесса, например, при мышечном сокращении. В нормальных условиях в организме существует равновесие между этими видами теплоты, т. е. уменьшение первичной теплоты сопровождается возрастанием вторичной и наоборот. В крайних условиях, например при переохлажде-

нии теплокровного животного, постоянство выделяемого тепла может поддерживаться двумя путями. Один из них заключается в увеличении доли выделяемой теплоты за счет вторичной теплоты, т. е. усиления сокращения мышц (дрожь). Второй путь — повышение теплопродукции организмом без дрожи, когда в клетках адаптированных животных наблюдается преимущественное выделение первичной теплоты в результате переключения основного пути окислительного метаболизма через дифосфопиридиннуклеотид на обходный путь через трифосфопиридиннуклеотид. Последний менее экономичен, имеет более низкий выход фосфорилирования и соответственно сопровождается большим рассеиванием энергии в виде тепла.

При расчетах теплового баланса эксперимент должен проводиться, очевидно, таким образом, чтобы свести выделение вторичного тепла до минимума.

Следствием первого закона термодинамики является закон Гесса, который утверждает, что *тепловой эффект химической реакции, развивающейся через ряд последовательных стадий, не зависит от пути перехода, а лишь от разности теплосодержания конечных и исходных продуктов реакции.*

Закон Гесса позволяет вычислять тепловые эффекты таких реакций, которые совсем не протекают в условиях опыта, и таких, в которых невозможно определить тепловой эффект. Например, неизвестен тепловой эффект реакции неполного сгорания твердого углерода в окись углерода, поскольку углерод никогда не сгорает целиком в CO, а всегда происходит образование некоторого количества CO_2. Известны тепловые эффекты двух различных реакций:

$$C_{(тв)} + O_{2\,(газ)} = CO_{2\,(газ)} + 97 \text{ ккал/моль},$$

$$CO_{(газ)} + \frac{1}{2} O_{2\,(газ)} = CO_2 \left(_{(газ)}\right) + 68 \text{ ккал/моль}.$$

Вычитая эти уравнения, получим:

$$C_{(тв)} + \frac{1}{2} O_{2\,(газ)} = CO_{(газ)} + 29 \text{ ккал/моль},$$

т. е. величина теплового эффекта этой реакции должна равняться 29 *ккал/моль.*

С помощью этого закона можно точно рассчитать тепловой эффект сложной биохимической реакции в организме, не имея полной картины ее развития, не зная промежуточных звеньев, а имея данные только об исходных и конечных продуктах.

Закон Гесса используется также для вычисления калорийности отдельных пищевых продуктов. Хотя питательные вещества после введения в организм претерпевают сложные изменения на пути превращения в конечные продукты метаболизма, суммарный энергетический эффект всех этих реакций равен тепловому эффекту непосредственного сжигания введенных веществ. Напри-

мер, при окислении глюкозы до CO_2 и H_2O выделяется энергия, эквивалентная 678 *ккал*, что соответствует тому количеству тепла, которое выделяется при сжигании 1 моля глюкозы в калориметрической бомбе. Пути, по которым идут реакции в организме и калориметрической бомбе, различны, однако энергетический эффект реакции один и тот же, поскольку одинаковы начальное и конечное состояния участвующих в реакции веществ.

ВТОРОЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ В БИОЛОГИИ

Второй закон термодинамики устанавливает закономерности перехода какого-либо вида энергии в работу и другие виды энергии.

Для биологии важен вопрос о приложимости к живым системам второго закона термодинамики и понятий, вытекающих из определения этого закона: градиент, энтропия, свободная энергия,

Градиент. Основное положение второго закона термодинамики сводится к тому, что: *невозможно перевести тепло от более холодной системы к более горячей при отсутствии одновременных изменений в обоих системах или окружающей среде.* Следствием этого положения является утверждение, что *самопроизвольно могут протекать лишь процессы, связанные с переносом энергии от более высокого уровня к более низкому, т. е. по градиенту.*

Градиент какого-либо параметра системы определяется как разность величин этого параметра в двух точках, отнесенная к расстоянию между ними. Математически, градиент — это вектор, т. е. функция, характеризующаяся не только величиной, но и направлением.

Когда сравнивается живая клетка с неживой системой, то первое отличие, которое бросается в глаза — это наличие в живой клетке многочисленных градиентов. В качестве примера можно привести осмотический градиент, присущий всем живым клеткам и играющий особенно значительную роль в жизнедеятельности растительных клеток (тургор); концентрационный градиент, обусловленный неравномерным распределением различных веществ между клеткой и наружной средой. Далее, известно, например, что в большинстве клеток содержание ионов калия внутри клетки значительно превышает содержание ионов калия в омывающей среде, в то время, как распределение ионов натрия подчиняется обратному соотношению. С неравномерным распределением ионов связано возникновение электрического градиента через оболочку клеток. Наличие градиентов открывает принципиальную возможность совершения работы в живой клетке. Например, генерация нервного импульса связана с реализацией неравномерного распределения ионов и электрического градиента. Набухание клеток связано с реализацией осмотического градиента и т. д. Характерно, что в мертвых клетках вышеуказанные градиенты отсутствуют.

Энтропия. Второй закон термодинамики устанавливает, что тепло само по себе без участия дополнительной энергии никогда не может быть полностью переведено в работу.

Работоспособность системы, ее к. п. д. определяется разницей (градиентом) между начальной и конечной температурой процесса, а величина потери определяется уравнением:

$$A = Q\frac{T_1 - T_2}{T_1}.$$

Мерой рассеивания энергии (ее деградации) является энтропия.

На рис. 2 показан принцип работы тепловой машины. В процессе работы часть тепла Q_1, от источника с температурой T_1 передается бесполезно холодильнику с температурой T_2 и количеством тепла Q_2. При обратимом процессе то же количество тепла будет переноситься от холодильника к источнику тепла за счет энергии внешней среды (например, в электрохолодильнике за счет электроэнергии). Количественно этот процесс характеризуется равенством отношений:

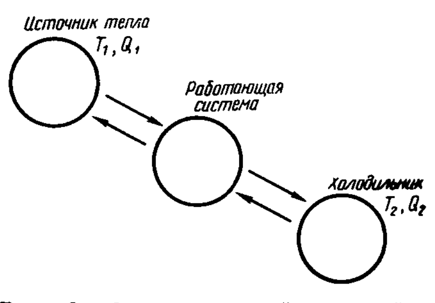


Рис. 2. Схема реальной тепловой машины.
Объяснение см. в тексте

$$\frac{Q_1}{T_1} = \frac{Q_2}{T_2}.$$

Это отношение есть не что иное, как энтропия, т. е.

$$S_1 = \frac{Q_1}{T_1} \text{ и } S_2 = \frac{Q_2}{T_2}.$$

Таким образом, бесполезная растрата части тепловой энергии в ходе обратимого рабочего процесса численно равна энтропии. При обратимом процессе: $\frac{Q_1}{T_1} = \frac{Q_2}{T_2}$, или $S_1 - S_2 = 0$. Любой необратимый процесс (трение, передача тепла) сопровождается значительной растратой тепловой энергии, т. е. в этом случае:

$$S_1 - S_2 > 0.$$

Эти общие положения переносятся и на другие виды энергии.

В живых организмах источником работы является химическая энергия, которая переходит в работу и тепло. Тепло рассеивается, и этот процесс полностью необратим.

Возможно ли вообще полное превращение тепла в работу без потерь?

Рассмотрим замкнутый сосуд, разделенный перегородкой на две равные части и содержащий, например, восемь молекул газа. Стенки сосуда хорошо проводят тепло и, таким образом, система находится в постоянном тепловом равновесии с окружающей средой. Исходно все молекулы равномерно распределены по обе

стороны перегородки, т. е. в каждом отсеке находится по четыре молекулы. Подождем момента, когда все молекулы самопроизвольно соберутся в одном из двух отсеков. Такое событие вероятно, но вероятность его зависит от числа частиц n по закону $p=\left(\frac{1}{2}\right)^n$, где p — математическая вероятность события. Из формулы видно, что вероятность события быстро уменьшается с возрастанием числа частиц в системе. Переход одной молекулы в левую или правую части системы равновероятен — $p=\left(\frac{1}{2}\right)^1$; вероятность же собрания восьми молекул по одну сторону перегородки уже достаточно мала: $p=\left(\frac{1}{2}\right)^8$. Допустим все же, что это событие произошло, и превратим нашу систему в рабочий механизм, поставив вместо перегородки поршень. Поскольку система замкнута, молекулы газа в следующий момент после самопроизвольного сжатия будут стремиться расшириться в результате теплового движения и занять первоначальный объем. При этом они будут давить на поршень, который сместится и произведет механическую работу. Таким образом, тепловая энергия окружающей среды превращается в кинетическую энергию молекул, совершающих работу. Система в этих условиях не охладится, так как имеется хороший тепловой контакт с окружающей средой и таким образом тепло окружающей среды полностью превратится в работу $\Delta Q = \Delta A$. Это как будто противоречит второму началу термодинамики, но это противоречие в действительности кажущееся, поскольку нельзя построить реальную машину, работающую по этому принципу. Действительно, вероятность совершения рабочего цикла в идеальной системе, содержащей восемь молекул, уже очень мала $\left(\frac{1}{2}\right)^8$, а в реальной системе, содержащей миллионы молекул, вероятность такого события практически равна нулю $\left[\left(\frac{1}{2}\right)^{10}\right]$. Таким образом, система, построенная из двух частей: источник тепла — рабочее тело, не может функционировать в реальных условиях.

В соответствии со вторым началом система должна быть изменена: добавлен холодильник, которому бесполезно передается часть тепла. Таким образом, тепло не может быть полностью превращено в работу.

Математическое выражение второго закона термодинамики может быть написано следующим образом:

$$dS=\frac{\delta Q}{T}\geqslant 0, \tag{1.3}$$

где знак равенства относится к случаю обратимых процессов, а знак неравенства к необратимым процессам. Таким образом, второй закон термодинамики утверждает, что *в замкнутой системе*

энтропия может либо оставаться неизменной (в случае обратимой реакции), *либо возрастать* (при необратимом процессе).

Следовательно, если энтропия изменяется, то ее изменение есть мера необратимости процесса.

Второй закон термодинамики называют также законом об энтропии. Понятие энтропии тесно связано с понятием градиента. Энтропия растет с уменьшением градиента при необратимых процессах. Поскольку большинство биологических процессов необратимы с точки зрения термодинамического критерия необратимости, то, следовательно, при этих процессах в замкнутой системе энтропия всегда возрастает. Таким образом, второй закон термодинамики для необратимых процессов указывает направление процесса. Необратимые процессы всегда протекают в направлении возрастания энтропии.

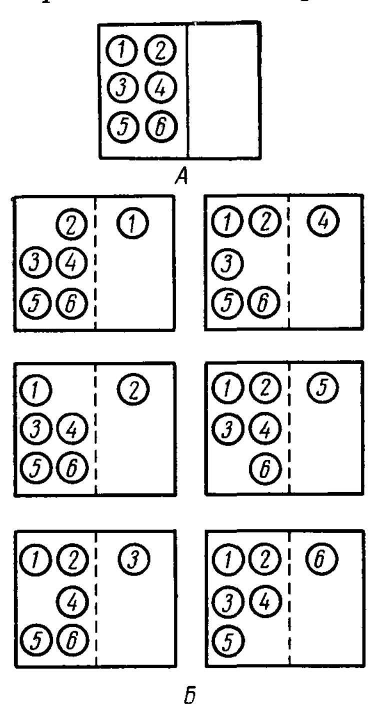


Рис. 3. Распределение шести пронумерованных молекул между двумя частями сосуда. *А* — исходное соотношение 6 : 0, количество способов размещения равно 1; *Б* — соотношение 5 : 1, количество способов размещения равно 6. Остальные способы размещения см. на стр. 23

Статистический характер энтропии. Больцман установил связь, существующую между энтропией и термодинамической вероятностью процесса, выражаемую формулой:

$$S = k \ln w, \qquad (1.4)$$

где k — константа Больцмана,
w — термодинамическая вероятность.

Для лучшего понимания статистического характера энтропии рассмотрим систему, представляющую собой сосуд с двумя отсеками (рис. 3).

В сосуде находится шесть пронумерованных молекул, исходно собранных в левой части сосуда (рис. 3, *А*). Рассмотрим вероятность распределения молекул в двух частях сосуда после удаления перегородки (рис. 3, *Б*). Очевидно, что в результате теплового движения все молекулы распределятся по всему сосуду и число всех размещений будет равно $2^6 = 64$.

Термодинамическая вероятность показывает, сколькими способами можно осуществить распределение молекул. Эта величина всегда заведомо больше единицы. Ее необходимо отличать от

Вероятность распределения молекул в системе, изображенной на рис. 3, такова:

Число молекул слева	*Число молекул справа*	*Число размещений (термодинамическая вероятность, w)*	*математическая вероятность*
6	0	1	$\frac{1}{64}$
5	1	6	$\frac{6}{64}$
4	2	15	$\frac{15}{64}$
3	3	20	$\frac{20}{64}$
2	4	15	$\frac{15}{64}$
1	5	6	$\frac{6}{64}$
0	6	1	$\frac{1}{64}$
		64	1

математической вероятности, которая показывает вероятность того или иного события, отнесенную ко всем возможным событиям; эта величина всегда меньше единицы. Из приведенных выше данных видно, что термодинамическая вероятность распределения молекул, например, в соотношении 6 (слева) : 0 (справа) равна единице; вероятность распределения 5 : 1 равна 6 и т. д. Наиболее вероятным является равновесное распределение — 3 : 3; это распределение соответствует максимуму энтропии (см. формулу 1.4).

Величина энтропии, таким образом, является функцией вероятности, т. е. любой необратимый процесс, сопровождающийся возрастанием энтропии, означает переход системы в наиболее вероятное состояние. В состоянии равновесия, к которому всегда стремятся придти системы, вероятность максимальна.

Свободная энергия. Второй закон термодинамики ограничивает процесс превращения тепловой энергии в работу. Это распространяется и на механическую, электрическую и химическую энергию в той мере, в которой превращение этих видов энергии необратимо. Условно эти виды энергии относят к высшей группе по сравнению с тепловой, поскольку эти виды энергии теоретически могут полностью переходить в работу с к. п. д. 100%. Переход же тепловой энергии в работу ограничен принципом Карно (см. формулу 1.2 на стр. 15).

Такое разделение видов энергии связано с тем, что тепловая энергия является, образно выражаясь, наиболее деградированным видом энергии, обусловленным хаотическим тепловым движением микрочастиц, составляющих систему. Механическая, электрическая и химическая энергии связаны с упорядоченным движением

частиц и могут самопроизвольно и полностью превращаться в тепло, в то время как переход тепловой энергии в другие виды энергии требует дополнительных затрат энергии извне.

Однако необходимо отметить, что в живом организме, где основными видами энергии являются химическая, электрическая и механическая, не наблюдается процессов, протекающих с к. п. д. 100%. Это объясняется необратимостью биологических процессов.

Величины к.п.д. различных биологических процессов

Биологический процесс	*к. п. д. в %*
Гликолиз	36
Окислительное фосфорилирование	55
Свечение бактерий	до 90
Сокращение мышц	30
Фотосинтез	75

Поэтому возникает необходимость определения той части энергии, которая может быть полностью превращена в работу. Она, очевидно, будет тем меньше, чем больше необратимость процесса, т. е. чем больше энтропия.

Перепишем уравнение первого закона термодинамики (1.1), используя уравнение (1.3)

$$T\,dS = dU + \delta A, \tag{1.5}$$

откуда:

$$dU = T\,dS - \delta A. \tag{1.5а}$$

Полезная работа, равная $-\delta A$, будет определяться следующим выражением:

$$-\delta A = dU - T\,dS, \tag{1.5б}$$

$$-\delta A = d\,(U - TS). \tag{1.5в}$$

Выражение в скобках обозначается буквой $F = U - TS$ и является выражением свободной энергии. Формулу эту можно переписать в следующем виде:

$$dF = dU - T\,dS. \tag{1.6}$$

Свободная энергия, т. е. энергия, способная превратиться в работу, равна внутренней энергии за вычетом TdS.

При стремлении системы к равновесию величина TdS, как мы установили, возрастает, следовательно свободная энергия системы уменьшается и становится равной нулю при равновесии.

Таким образом, *термодинамическое равновесие характеризуется максимумом энтропии и минимумом свободной энергии.*

Необходимо отметить, что, согласно классической термодинамике, *точное количественное выражение основных термодинамических величин* (энтропии, свободной энергии, внутренней энергии, энтальпии и др.) *можно получить только в случае обратимого процесса*.

Исходя из второго закона термодинамики, полный переход тепловой энергии в работу не может произойти без соответствующей компенсации, которая обусловлена либо изменением состояния системы, либо изменением в окружающей среде. Можно назвать процесс перехода системы из одного состояния в другое обратимым, если обратный переход не связан с некомпенсированным превращением энергии в работу. Процесс перехода системы из одного состояния в другое называется необратимым, если обратный переход связан с необходимостью затраты излишка энергии извне. Это — термодинамический критерий обратимости. Этот критерий не совпадает с понятием обратимости или необратимости биохимических реакций. Биохимическую реакцию называют обратимой, если она может осуществляться как в прямом, так и в обратном направлении, несмотря на то, что возвращение реакционной смеси в исходное состояние сопряжено с некомпенсированными потерями энергии. Более того, в организме функционируют различные обратимые биохимические циклы, например, цикл трикарбоновых кислот, в котором возвращение продуктов реакции в исходное состояние включает множество побочных реакций, в том числе и необратимые процессы — диффузию.

Такое различие в толковании обратимости связано с различием в толковании понятия термодинамического или устойчивого равновесия, поскольку для химических реакций понятия обратимость и равновесие совпадают. При равновесном процессе, т. е. процессе, идущем через ряд равновесных состояний, в каждый данный момент система находится в состоянии, бесконечно близком к равновесию, и достаточно незначительно изменить условия, чтобы процесс был обращен. Исходя из этого, можно полагать, что движение к равновесию химической реакции заключается в стремлении достигнуть равновесия и остановиться. Однако на самом деле равновесие химической реакции является динамическим. Оно устанавливается не вследствие отсутствия или прекращения процесса, а вследствие протекания его одновременно в двух противоположных направлениях с одинаковой скоростью. Это положение аксиомируется в теории абсолютных скоростей реакции, которая предполагает, что все химические (биохимические) реакции обратимы и используют термодинамические параметры для описания кинетики биохимических процессов.

Таким образом, при использовании термодинамики для описания биохимических реакций необходимо учитывать, что биохи-

мические процессы, как и многие другие процессы, могут лишь в той или иной степени приближаться к равновесным и считаться обратимыми.

Существует формальный признак, с помощью которого можно отличить обратимые процессы от необратимых.

Рассмотрим уравнения, описывающие течение процессов, идущих во времени. Если эти уравнения инвариантны по отношению к (алгебраическому) знаку у переменной —«время», то процесс называется обратимым, в противном случае он называется необратимым. В уравнения, описывающие обратимые процессы, время входит через свою арифметическую величину.

В качестве примера можно рассмотреть волновое уравнение, описывающее распространение волн в непоглощающей среде:

$$\frac{1}{c^2}\cdot\frac{\partial^2 U}{\partial t^2}=\frac{\partial^2 U}{\partial x^2}+\frac{\partial^2 U}{\partial y^2}+\frac{\partial^2 U}{\partial z^2},$$

где U — напряженность поля,
c — скорость света,
x, y, z — координаты.

Очевидно, что это уравнение не изменяется при замене t на $-t$ и, следовательно, распределение волн, описываемое этим уравнением, является обратимым процессом.

С другой стороны, уравнение Фурье для теплопроводности:

$$\frac{1}{a}\cdot\frac{\partial T}{\partial t}=\frac{\partial^2 T}{\partial x^2}+\frac{\partial^2 T}{\partial y^2}+\frac{\partial^2 T}{\partial z^2},$$

где T — температура,
x, y, z — координаты,
a — коэффициент теплопроводности,
не является инвариантным по отношению к подобной замене и таким образом уравнение описывает необратимый процесс, а именно необратимое приближение к тепловому равновесию. Важный для биологии процесс диффузии является необратимым процессом, как это следует из закона Фика (см. стр. 161).

РАСЧЕТ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

На отдельных этапах метаболизма протекают биохимические реакции, которые можно считать обратимыми и для которых возможно рассчитать термодинамические параметры — свободную энергию, теплосодержание и энтропию. Знание этих величин позволит на основании второго закона термодинамики предсказать направление той или иной реакции.

Если реакция обратима, то свободная энергия системы равна максимальной работе, если же реакция необратима, то часть энергии рассеивается в виде тепла, и совершенная работа будет

соответственно меньше. Обычно биохимические реакции протекают в условиях постоянства давления и температуры, поэтому уравнение (1.6) можно заменить аналогичным:

$$dZ = dH - T\,dS, \qquad (1.7)$$

где dZ — изменение свободной энергии при постоянном давлении и температуре или термодинамический потенциал, dH — теплосодержание или энтальпия. Величину dZ необходимо отличать от dF — свободной энергии системы при постоянном объеме и температуре.

Величина термодинамического потенциала связана с константой равновесия обратимой биохимической реакции соотношением:

$$\Delta Z = \Delta Z_0 + RT \ln k, \qquad (1.8)$$

где k — константа равновесия реакции. Величина ΔZ равняется стандартной свободной энергии реакции (ΔZ_0), если все исходные вещества и продукты реакции содержатся в растворе при 25° С и при активности, равной единице. Величину ΔZ_0 можно определить различными способами: чаще всего по формуле (1.8). Учитывая, что при равновесии $\Delta Z = 0$ наиболее удобным является сочетание соответствующих химических уравнений с известными значениями ΔZ_0. Для примера рассмотрим реакцию окисления пальмитиновой кислоты до CO_2 и H_2O

$$C_{16}H_{32}O_2 + 23O_2 = 16CO_2 + 16H_2O$$

Из справочных таблиц известно, что ΔZ_0 образования пальмитиновой кислоты, CO_2 и H_2O равны:

$$C_{16}H_{32}O_2 = 16C + 16H_2 + O_2, \qquad \Delta Z_0 = 80 \text{ ккал},$$
$$16C + 16O_2 = 16CO_2, \qquad \Delta Z_0 = -1511{,}2 \text{ ккал},$$
$$16H_2 + 8O_2 = 16H_2O, \qquad \Delta Z_0 = -907{,}04 \text{ ккал}.$$

Если сложить эти три химические уравнения, то получится уравнение окисления пальмитиновой кислоты. Сложение величин стандартной свободной энергии ΔZ_0 дает величину — 2338,24 *ккал* на моль. Знак минус указывает на то, что окисление пальмитиновой кислоты является термодинамически самопроизвольным процессом и протекает до конца с большим выделением энергии.

Изменение теплосодержания ΔH можно определить путем измерения теплового эффекта реакции при сгорании вещества в калориметрической бомбе. В этом случае $\Delta H = -\Delta Q$. Второй способ заключается в определении температурной зависимости реакции. При этом по уравнению изобары реакции:

$$\frac{d \ln k}{dT} = -\frac{Q}{RT^2} \qquad (1.9)$$

можно определить $\Delta H = -\Delta Q$. Располагая данными о величине ΔZ_0, ΔH, легко определить ΔS по уравнению (1.7), в котором

дифференциалы соответствующих величин нужно заменить конечными значениями этих величин. Обычно стандартные значения этих величин приводятся в биохимических справочниках.

Энергия связи и богатая энергией связь. Изменение свободной энергии при образовании какого-либо биохимического соединения тесно связано с изменением энергии химической связи между атомами реагирующих молекул. Путем анализа молекулярных формул и данных о теплотах реакций можно определить энергию связи. Было найдено, что энергия локализована в валентных связях, причем связь каждого типа обладает энергией, называемой средней энергией связи. Для вычисления средних энергий связи пользуются данными о величинах теплот сгорания и теплот диссоциации молекул на атомы. Теплоты диссоциации обычно определяются спектроскопически при изучении спектров колебательных уровней молекул и атомов.

Для определения, например, энергии связи N — H рассмотрим реакцию образования моля NH_3 из атомов N и H

$$2N + 6H = 2NH_3.$$

По данным спектроскопии теплота образования моля N_2 из атомов N равна 169, а моля H_2 из атомов H — 101,9 *ккал*

$$N + N = N_2 + 169\ \textit{ккал},$$
$$H + H = H_2 + 101{,}9\ \textit{ккал}.$$

Следовательно, энергия образования одного моля N_2 и трех молей H_2 из атомов составляет:

$$169\ \textit{ккал} + 3 \cdot 101{,}9\ \textit{ккал} = 474{,}7\ \textit{ккал}.$$

К этому надо прибавить теплоту образования $2NH_2$ из газообразных N_2 и H_2, которая равна:

$$N_2 + 3H_2 = 2NH_3 + 18{,}6\ \textit{ккал}.$$

Таким образом, энергия образования одного моля NH_3 равна:

$$\frac{474{,}7\ \textit{ккал} + 18{,}6\ \textit{ккал}}{2} = 246{,}7\ \textit{ккал}.$$

Если принять, что все три атома H равноправны в молекуле NH_3, то прочность связи, или средняя энергия связи, N — H равна $\frac{246{,}7}{3} = 82$ *ккал*. Ниже приведены данные об энергии связи других типов.

Средние энергии связи различных типов

Тип связи	*Средняя энергия*	*Тип связи*	*Средняя энергия*
C—C	58,6 *ккал*	S—H	87,5
N—N	20,0 »	C—N	48,6
O—O	34,9 »	C—O	70,0
P—O	50,0 »	C—S	57,5
S—S	63,8 »	C=C	100,0
C—H	87,3 »	C≡C	123
N—H	82,0 »	C=O	142
O—H	110,2 »	H—H (водородная связь)	4—8

Из этих данных видно, что наиболее слабой является водородная связь.

В биологии широко распространен термин «связь, богатая энергией», или «макроэргическая связь». Такими связями обладают так называемые макроэргические соединения, из которых наиболее важным является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ).

Под энергией макроэргической связи подразумевается свободная энергия, освобождаемая в ходе биохимической реакции с участием богатого энергией соединения.

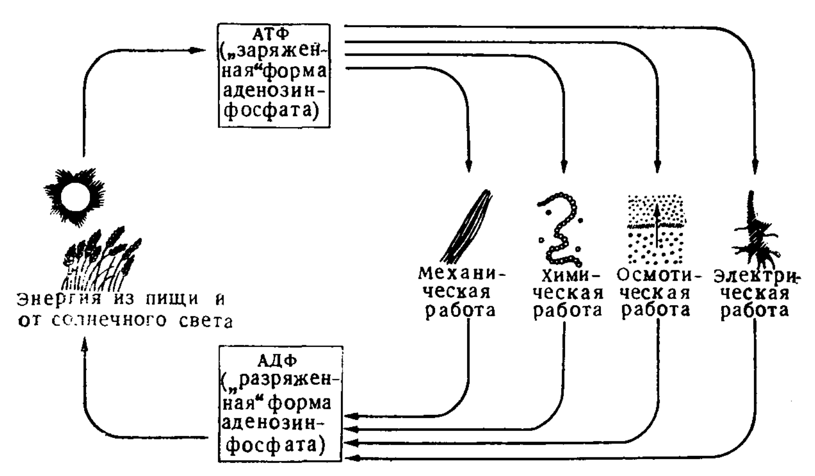


Рис. 4. Схема использования энергии АТФ в живой клетке

А. Г. Пасынский отмечает, что в этом случае речь идет не о термохимическом определении энергии связи, а о свободной энергии реакции гидролиза молекулы АТФ:

$$АТФ + H_2O = АДФ + H_3PO_4.$$

При переносе фосфатной группы на воду выделяется около 7,0—8,5 *ккал/моль* свободной энергии. Следовательно, по отношению к молекуле АТФ или другого аналогичного соединения дело вовсе не заключается в том, чтобы разорвать связь крайних Р и получить из АТФ, которую можно изобразить как А — Р — Р — — Р, переход в А — Р — Р и Р. На это необходимо было бы затратить большое количество энергии порядка 50 — 100 *ккал/моль* [1]. В этом смысле АТФ не обладает каким-то большим запасом энергии, которая только ждет случая выделиться, подобно энергии взрывчатого вещества; напротив, АТФ является достаточно стабильным соединением. В действительности, процесс заключается в переносе фосфатной группы на воду с выделением большого количества свободной энергии. Глюкозо-6-фосфат имеет энергию

[1] См. средние значения энергии связи на стр. 28.

фосфатной связи порядка 50—100 *ккал/моль*, но при переносе фосфатной группы на воду в этом случае освобождается лишь около 3 *ккал/моль* свободной энергии, поэтому глюкозо-6-фосфат не является соединением, богатым энергией.

Термодинамически молекулу АТФ в клетке можно рассматривать как универсальную богатую энергией или «заряженную» форму носителя энергии, а АДФ — как бедную энергией или «разряженную» форму. Участие АТФ в метаболизме клетки и в совершении клеткой различного вида работы показано на рис 4.

СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ

Открытая система не может находиться в состоянии термодинамического равновесия, поскольку последнее характеризуется полным отсутствием каких-либо процессов, что, очевидно, противоречит самому определению открытой системы.

Состояние называется стационарным, если параметры системы с течением времени не изменяются.

Открытая система обменивается с окружающей средой веществом и энергией, поэтому изменение энтропии в такой системе разделяют на две части. Обозначая через dS_e поток энтропии, обусловленный взаимодействием с окружающей средой, а через dS_i часть энтропии, обусловленную изменениями внутри системы, можно представить общее изменение энтропии в системе как:

$$dS = dS_i + dS_e. \qquad (1.10)$$

Приращение энтропии dS_i, обусловленное изменениями внутри системы, в силу второго закона термодинамики может иметь только положительное значение или равняться нулю. Величина dS_i равна нулю только тогда, когда система претерпевает обратимые изменения, но она всегда положительна, если в системе идут необратимые процессы. Таким образом: $dS_i = 0$ для обратимых процессов, $dS_i > 0$ для необратимых процессов.

Величина dS_e может принимать любые значения: положительные, отрицательные и нулевые. В изолированной системе обмена с окружающей средой нет и $dS_e = 0$, а $dS = dS_i$, т. е. приращение энтропии всей системы определяется приростом энтропии внутри системы. Наиболее интересен случай, когда величина dS_e отрицательна и по абсолютной величине больше прироста энтропии в системе dS_i. При этом общее изменение энтропии в открытой системе становится отрицательным. *Таким образом, теория открытых систем предполагает случай уменьшения энтропии в системе за счет взаимодействия с окружающей средой.* При равенстве $dS_i = -dS_e$ общее изменение энтропии равно нулю, что соответствует случаю стационарного состояния.

Как уже отмечалось, если в системе все параметры постоянны во времени и нет никаких стационарных потоков за счет действия

каких-либо внешних источников, то состояние системы называется равновесным (состояние термодинамического равновесия). Основные черты сходства и различия стационарного равновесия и равновесия термодинамического заключены в трех параметрах. Это — энтропия, свободная энергия и время. Как мы установили (см. стр. 24), термодинамическое равновесие не зависит от времени, энтропия его максимальна, а свободная энергия равна нулю, т. е. система полностью деградирована и не в состоянии производить работу.

Сходство термодинамического равновесия со стационарным заключается в независимости от времени, т. е. *подобно равновесной системе, стационарная система во времени сохраняет свои основные параметры неизменными.* Энтропия стационарной системы имеет некоторую постоянную величину $dS = \text{const}$, не равную максимальной. *Свободная энергия, или термодинамический потенциал, стационарной системы не равен нулю, а характеризуется некоторой постоянной величиной* $dZ = \text{const}$. Это означает, что стационарная система не находится в деградированном состоянии, а будучи выведена из равновесия, способна производить работу, прежде чем достигнет термодинамического равновесия.

Принципиальное отличие термодинамического равновесия от стационарного заключается в появлении кинетического параметра.

Уравнение (1.10) можно написать в следующем виде:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS_i}{dt} + \frac{dS_e}{dt}. \tag{1.10a}$$

Таким образом, в стационарном состоянии организма скорость создания энтропии внутри организма равна скорости обмена энтропии с окружающей средой. В стационарном состоянии скорость приращения энтропии внутри системы, равная $\frac{dS_i}{dt} = -\frac{dS_e}{dt}$, отлична от нуля и становится одной из важнейших величин, характеризующей наряду с энтропией и свободной энергией открытую стационарную систему. Отличие $\frac{dS_i}{dt}$ от нуля означает также неравенство потоков вещества в прямом и обратном направлении. Описывая обратимые химические реакции, мы подчеркивали, что термодинамическое равновесие определяется равенством прямой и обратной реакции и в этом случае $\frac{dS_i}{dt} = 0$. В стационарном состоянии $\frac{dS_i}{dt} = -\frac{dS_e}{dt} \neq 0$, а равно константе.

Стационарному равновесию соответствует уравнение:

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{dS_e}{dt}.$$

Таким образом, *в стационарном состоянии скорость прямой реакции может превышать скорость обратной реакции, но раз-*

ность скоростей должна поддерживаться постоянной во времени.

Наиболее примечательные свойства стационарной системы — это стремление к минимуму величины ежесекундного прироста энтропии $\frac{dS_i}{dt}$ и определенная внутренняя стабильность.

Для наглядности рассмотрим свойства стационарного состояния на гидродинамической модели, предложенной Бэртоном (A. Burton, 1939) (рис. 5.).

Сосуд S, в котором уровень жидкости постоянен (или за счет большого объема сосуда S по сравнению с объемом сосудов A и B, или в результате работы насосного механизма) играет роль внешней среды (источник), а сосуд Z — роль стока. Он также относится к внешней среде. Сосуды A и B, связанные с внешней средой кранами K_O и K_Z, представляют собой рассматриваемую нами открытую систему. Краны K_O и K_Z регулируют скорость поступления и стока воды и имитируют процесс диффузии, или процесс переноса веществ через клеточную оболочку. Стационарное состояние возникает при определенных уровнях жидкости в сосудах A и B и определенных положениях кранов K_O, K, K_Z. Эти уровни соответствуют стационарным концентрациям реагирующих веществ в случае химической реакции. Кран K регулирует скорость перетекания воды из сосуда A в сосуд B, играя, таким образом, роль, аналогичную константе скорости реакции. Уровень жидкости в сосуде B служит показателем стационарной системы, для чего он с помощью поплавка и передающей системы соединен с регистрирующей системой — кимографом N. В стационарных условиях уровень воды в сосуде постоянен. Если же изменить положение крана K, то уровень в сосуде B изменится, т. е. система перейдет в новое стационарное состояние. При этом выявится одно существенное свойство такой системы. Поскольку скорость вытекания воды зависит от гидростатического давления, создаваемого столбом жидкости, при установлении нового стационарного состояния уровень в сосуде B пройдет сначала через некоторое максимальное или минимальное значение (в зависимости от соотношения кранов K_O и K_Z), а затем стабилизируется на некоторой высоте, более близкой к исходному уровню, чем достигавшийся в переходном процессе максимум или минимум.

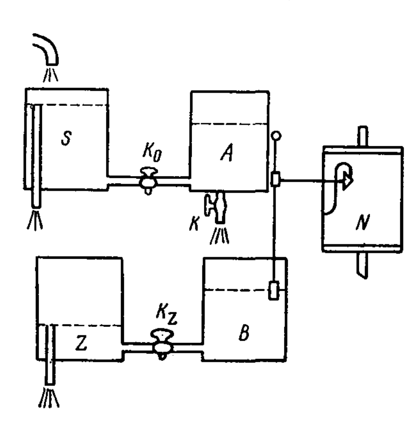


Рис. 5. Гидродинамическая модель стационарного состояния (по Бэртону)
Объяснение см. в тексте

Это свойство определенной внутренней стабилизации стационарной системы проявляется во всех случаях, когда скорости процессов зависят от концентрации реагирующих веществ, что всегда имеет место в биологической системе при протекании в ней биохимических реакций.

Для того, чтобы можно было распространить выводы, полученные на гидродинамической модели, на живой организм, необходимо сопоставить формальное описание модели с явлениями, которые наблюдаются в живой природе. Необходимым условием существования модели, как было показано, является постоянство уровней внешней среды, представленных сосудами S и Z. Это условие является необходимым для существования организма в условиях внешней среды. Ранее отмечалось, что постоянство обеспечивается двумя различными путями: во-первых, бо́льшим объемом «источника» и «устья», так, чтобы взаимодействие внешней среды с внутренней не сказывалось на этом объеме. Этот случай соответствует условиям существования системы: живой организм — воздушная среда. Действительно, количество атмосферного кислорода и углекислого газа не изменяется под влиянием окислительных процессов, протекающих в животном организме, хотя кислород является «источником», а углекислота — «устьем» открытой системы — живой организм. Во-вторых, уровень «источника» и «стока» может поддерживаться постоянным за счет активных метаболических процессов в организме. Хорошо известно, что уровень сахара в крови и pH поддерживаются на постоянном уровне различными регуляторными механизмами, связанными с энергией обмена веществ. Таким образом, аналогия между организмом и гидродинамической моделью, описывающей характерные свойства стационарной системы, вполне оправдана.

Характерным свойством живого организма, помимо постоянства параметров, являются также совершенно определенные реакции на внешние воздействия, которые выводят организм из стационарного состояния.

Такие явления, как возбуждение, мышечное сокращение, генерация нервного импульса и другие, являются примерами переходных процессов между стационарными уровнями.

Обратимся к модели. Будучи выведена внешним стимулом из состояния стационарного равновесия, система переходит к новому стационарному уровню по различным переходным кривым (рис. 6).

Кривая b отражает переходный процесс, в котором промежуточный уровень выше конечного. Такой тип кривой называется кривой с избыточным отклонением (овершут). Кривая c отражает такое изменение системы, когда уровень сначала понижается, а затем возрастает до конечного стационарного уровня. Такой тип кривой называется «ложный старт». В биологии оба типа имеют широкое распространение при описании различных процессов.

Переход по *b* типу можно наблюдать при изменении ритма биения сердца лягушки в случае изменения условий, при приспособлении бактерий к новым условиям среды и т. д. Это явление соответствует «привыканию» организма к новым условиям. «Ложный старт» наблюдается в ряде процессов, например, при нарушении скорости дыхания клеток кончиков корешков лука в результате изменения давления кислорода. Если корешки поместить в анаэробные условия на 5—45 *мин*, то при последующей подаче кислорода дыхание их устанавливается на новом стационарном уровне, более низком, чем исходный. Однако в первые минуты после подачи кислород потребляется гораздо быстрее, чем в исходных условиях до анаэробиоза. Это первоначальное изменение скорости дыхания происходит в направлении, противоположном общему направлению — от более высокого стационарного уровня к более низкому, и может быть названо «ложным стартом». Его связывают с протеканием реакции окисления продуктов анаэробного обмена, накопившихся в корешках.

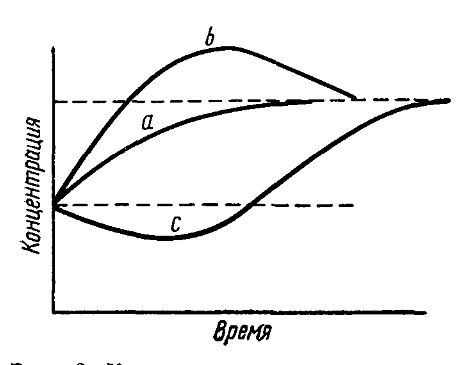


Рис. 6. Кривые переходов между стационарными состояниями.

По оси абсцисс — время (t), по оси ординат — разность между концентрациями стационарной и исходной: *a* — экспоненциальное приближение, *b* — переход с избыточным отклонением, *c* —«ложный старт»

Устойчивость стационарного состояния и характер переходных процессов можно проиллюстрировать примером модели нервного возбуждения. Существует огромное количество моделей, в той или иной мере полно отражающих последовательность и характерные свойства возбуждения. Например, Теореллом (T. Teorell) детально проанализированы свойства физико-химической модели возбуждения, в которой возникновение скачка потенциала обусловлено суперпозицией трех сил: концентрационного градиента, электрического градиента и гидростатического градиента в заряженной пористой мембране.

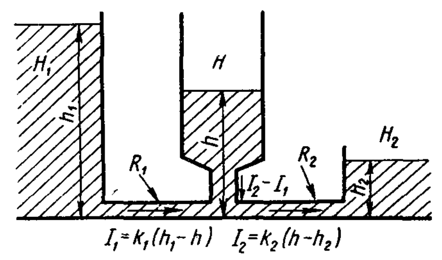


Рис. 7. Гидродинамическая модель открытой динамической системы.

Объяснение см. в тексте

Анализ устойчивости и неустойчивости стационарной системы удобно провести с простейшей гидродинамической моделью, ана-

логичной модели Бэртона. Система состоит из трех сосудов: H_1, H и H_2, соединенных трубками R_1 и R_2 (рис. 7).

Уровень жидкости в сосудах H_1 и H_2, как и в модели Бэртона, поддерживается постоянным. Жидкость имеет определенную вязкость и подчиняется закону Пуазейля. Скорость течения в трубках пропорциональна разности уровней в сосудах:

$$\begin{aligned} &\text{для } R_1 \quad I_1 = k_1 (h_1 - h), \\ &\text{для } R_2 \quad I_2 = k_2 (h - h_2), \end{aligned} \tag{1.11}$$

где k_1 и k_2 — коэффициенты, имеющие размерность проводимости (обратно пропорциональны сопротивлению).

Сосуд H вместе с соединительными трубками моделирует рассматриваемую открытую систему в стационарном состоянии.

В результате непрерывного протекания жидкости в системе будет возрастать количество положительной энтропии, поскольку трение жидкости о стенки сосуда является необратимым процессом. Скорость создания энтропии будет равна произведению скорости потока на силу, его вызывающую, т. е. на разность уровней в сосудах:

$$\begin{aligned} &\text{для } R_1 \quad T\frac{dS_1}{dt} = I_1 (h_1 - h), \\ &\text{для } R_2 \quad T\frac{dS_2}{dt} = I_2 (h - h_2), \end{aligned} \tag{1.12}$$

где T — абсолютная температура,

$\frac{dS}{dt}$ — приращение энтропии,

I_1 и I_2 — скорость потока,

$(h_1 - h)$ и $(h - h_2)$ — разность уровней в сосудах.

В формуле (1.12) выражения слева и справа имеют размерность мощности, т. е. показывают количество энергии, выделяемой в единицу времени: слева — тепловой энергии ($T\Delta S = \Delta Q$, см. стр. 20), справа — механической энергии. Таким образом, эти формулы показывают, какое количество механической энергии в трубках R_1 и R_2 переходит в тепло в силу необратимости процесса трения. Эти формулы полностью эквивалентны случаю выделения джоулева тепла, например, при протекании электрического тока через проводник. В последнем случае I — это сила тока, а разность уровней заменяется напряжением.

Суммарное приращение энтропии во всей системе будет равно:

$$T\frac{dS}{dt} = T\frac{dS_1}{dt} + T\frac{dS_2}{dt} = I_1 (h_1 - h) + I_2 (h - h_2).$$

Учитывая формулу (1.11), это выражение можно переписать:

$$T\frac{dS}{dt} = k_1 (h_1 - h)^2 + k_2 (h - h_2)^2. \tag{1.13}$$

Обозначим $T\frac{dS}{dt}$ как $T\dot{S}$ и построим график зависимости $T\dot{S}$ от h, как показателя стационарности системы (рис. 8). Поскольку в правой части (1.13) h находится в квадрате, то зависимость $T\dot{S}$ от h будет иметь вид параболы. Направление ветвей параболы зависит от знака справа. Если k_1 и k_2 положительны, то ветви параболы направлены вверх (рис. 8, *a*). Этот случай соответствует устойчивому стационарному состоянию, которое характеризуется минимальной скоростью прироста энтропии (см. на стр. 41).

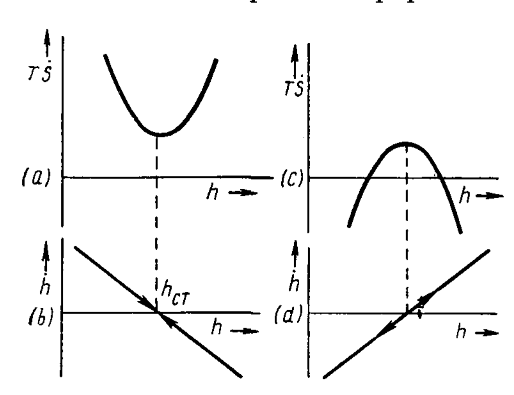


Рис. 8. Диаграмма, иллюстрирующая стационарное состояние в открытой системе: *a*, *b* — стабильное стационарное состояние. *c*, *d* — нестабильное стационарное состояние. Объяснение см. в тексте

На графике видно, что точка, соответствующая стационарному состоянию $h_{ст}$, имеет самое минимальное из всех значений $T\dot{S}$.

На рис. 8, *b* показана та же зависимость в других координатах, где по оси ординат отложена не величина приращения энтропии, а эквивалентная ей величина скорости изменения уровня жидкости в сосуде $H - \frac{dh}{dt}$, или $\dot{h}$. В этом случае зависимость имеет вид прямой линии, пересекающей ось абсцисс в точке, соответствующей $h_{ст}$. Стрелки показывают, что любое смещение уровня жидкости в сосуде H в устойчивом стационарном состоянии сопровождается его быстрым возвращением к прежнему уровню. Мысленно можно себе представить, что в нижней части параболы в точке $h_{ст}$ находится шарик, любое смещение которого влево или вправо будет сопровождаться его самопроизвольным возвращением на прежнее, наиболее устойчивое место.

Возбудимые системы характеризуются наличием неустойчивого стационарного состояния. Этому состоянию соответствует график, изображенный на рис. 8, *c* и 8, *d*. Ветви параболы направлены вниз, и точка $h_{ст}$ соответствует не минимуму, а максимуму приращения энтропии.

Таким образом, *для устойчивого стационарного состояния характерно минимальное приращение энтропии в системе, а для неустойчивого стационарного состояния — максимальное приращение энтропии.*

Если продолжить аналогию с шариком, то положение шарика на вершине параболы является неустойчивым и под влиянием

любого внешнего толчка он будет быстро удаляться от стационарного уровня (рис. 8, *d*).

Неустойчивое стационарное состояние характеризуется появлением отрицательной проводимости, так как либо k_1, либо k_2 должно быть в этом случае отрицательным. Если k_1 положительно, то выполняется следующее неравенство: $k_1 < -k_2$. Понятие отрицательной проводимости эквивалентно понятию отрицательного сопротивления, которое используется в радиотехнике при описании релаксационных колебаний.

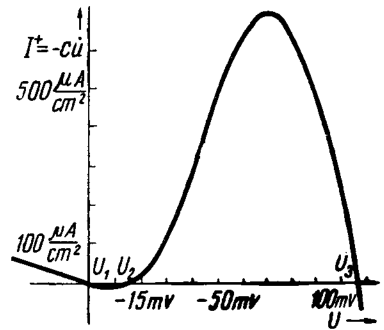


Рис. 9. Соотношение между $\dot{U}$ и U, наблюдаемое на мембране гигантского аксона кальмара: по оси абсцисс — мембранный потенциал, по оси ординат — ионный поток $I^+ = C m \dot{U}$. Объяснение см. в тексте

Таким образом, мы подошли к чрезвычайно важному понятию об устойчивой и неустойчивой стационарной системе. И в том и в другом случае система сохраняет свои свойства постоянными во времени. Однако, если устойчивому стационарному состоянию соответствует минимум прироста энтропии, то неустойчивое стационарное состояние характеризуется максимумом прироста энтропии. Для того, чтобы неустойчивое стационарное состояние оставалось стационарным, необходим значительный приток отрицательной энтропии или свободной энергии, чтобы компенсировать возникновение в системе положительной энтропии с максимальной величиной прироста. Отсюда следует важный вывод, что в неустойчивом состоянии, т. е. в состоянии с отрицательной проводимостью, могут находиться лишь открытые системы, в которых создание положительной энтропии внутри системы компенсируется притоком отрицательной энтропии или свободной энергии из окружающей среды.

Рассмотренные здесь условия нестабильности как основы возбуждения полностью подтверждаются экспериментальными данными, полученными Ходжкин, Хаксли и Катцом (A. L. Hodgkin, A. F. Huxlcy, B. Katz) на гигантском аксоне кальмара. Изученная авторами вольтамперная характеристика мембраны гигантского аксона кальмара приведена на рис. 9. Поскольку носителем электричества в случае нервного возбуждения являются ионы, то в этой работе измеряли потоки ионов, как функцию мембранного потенциала. Ионы Na и K при возбуждении движутся через мембрану и перезаряжают мембранную емкость C_m согласно уравнению:

$$I^+ = -C_m\dot{U} = f(U),$$

где I^+ — ионный поток,

C_m — емкость мембраны,

U — мембранная разность потенциалов,

$\dot{U} = \frac{dU}{dt}$ — изменение во времени разности потенциалов.

Таким образом, экспериментальная кривая отражает зависимость $\dot{U}$ от U, т. е. она аналогична зависимости, изображенной на рис. 8, *b* и 8, *d*. Как видно из рис. 9, кривая пересекает ось U в трех точках, соответствующих трем стационарным состояниям ($U_1 = 0$; $U_2 = -15$ *мв*; $U_3 = -100$ *мв*). Для U_1 и U_3 условия устойчивости полностью выполняются, так как наклон прямолинейного участка кривой в этих точках совпадает с наклоном прямой на рис. 8, *b*, которая характеризует устойчивое состояние системы. Напротив, в точке U_2 система неустойчива, так как наклон прямолинейного участка кривой в этой точке совпадает с наклоном прямой на рис. 8, *d*, т. е. соответствует неустойчивому состоянию. Величина $U_2 = -15$ *мв* является, очевидно, пороговой величиной возбуждения, а само нервное волокно при этом является системой с отрицательной проводимостью.

Таким образом, *термодинамический анализ позволил установить общие условия* (*открытая система*) *и важнейшее свойство* (*наличие отрицательной проводимости*) *возбуждения, протекающего по одним и тем же законам в живых и неживых системах.* Относительно механизма нервного возбуждения термодинамика может лишь ограничиться перечислением процессов, удовлетворяющих вышеперечисленным требованиям, например, таких как автокаталитическая химическая реакция или диффузия в возбудимой мембране. (О механизме возникновения возбуждения см. в гл. 7.)

ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЕ УРАВНЕНИЯ, ПРИНЦИП ВЗАИМНОСТИ ОНЗАГЕРА И ГРАНИЦЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИКИ НЕОБРАТИМЫХ ПРОЦЕССОВ

Все процессы, протекающие в живом организме, являются функцией времени и, казалось бы, введение в термодинамическое уравнение параметра времени позволит описать биологические явления не только качественно, но и количественно. Однако это оказалось не так просто, потому что в живом организме скорости процессов значительно различаются между собой. Например, процессы диффузии протекают значительно медленнее процессов автолиза и процессов, связанных с нервным и мышечным возбуждением. Аппарат термодинамики необратимых процессов в настоящее время не может быть использован для описания всех биологических явлений.

Термодинамика необратимых процессов при описании различных явлений в неживых и живых системах ограничивается областью действия, так называемых, феноменологических уравнений. Иными словами, она рассматривает процессы вблизи термодинамического равновесия, когда силы, вызывающие тот или иной процесс (обобщенные силы), линейно связаны (прямо пропорциональны) со скоростью этого процесса (обобщенный поток):

$$I_i = L_{ik} X_k, \tag{1.14}$$

где I_i — обобщенная скорость,
X_k — обобщенная сила,
L_{ik} — коэффициент пропорциональности.

Линейные уравнения отражают процессы, имеющие фундаментальное значение для биологии. Процессы диффузии или процессы проницаемости веществ через биологические мембраны, где количества веществ, переносимое в единицу времени, т. е. скорость переноса, пропорциональна градиенту концентраций описываются уравнением Фика:

$$\frac{dm}{dt} = DS\,\frac{dc}{dx},$$

где $\frac{dm}{dt}$ — скорость диффузии вещества,
S — площадь,
D — коэффициент диффузии,
$\frac{dc}{dx}$ — градиент концентрации.

К этому же классу уравнений относится уравнение, описывающее прохождение электрического тока, где сила тока пропорциональна градиенту электродвижущей силы (закон Ома):

$$I = \frac{U}{R},$$

где I — сила тока,
U — напряжение,
R — сопротивление.

Аналогичными формулами описываются и мономолекулярные биохимические реакции.

Аппарат термодинамики необратимых процессов используется в настоящее время для описания проникновения через биологические мембраны воды, неэлектролитов и электролитов (A. Katchalsky и др.). В такой сложной открытой системе, какой является живой организм, не может протекать обособленно какой-либо один процесс, а имеет место сопряжение многих процессов, взаимодействие которых между собой может иногда протекать весьма причудливо. В неживой природе такие явления известны и изучаются давно. Например, возникновение температурного градиента в прямоугольном стержне и диффузия тепла от более нагретой стенки к менее нагретой приводит к перераспределению растворен-

ного вещества — термодиффузии, при которой возникает концентрационный градиент (эффект Соре). Стационарное же поддержание разности концентраций сопровождается появлением разности температур на концах образца (эффект Дюфура). На стыке двух проводников с различной температурой возникает электродвижущая сила и наоборот, при прохождении электрического тока через стык двух различных проводников на стыке выделяется или поглощается тепло (тепло Пельтье).

Для биологических процессов большое значение имеет взаимодействие необратимых процессов, вызванных наложением электрического потенциала, и диффузии воды через мембраны. При этом имеет место появление электроосмотического эффекта и связанного с ним явления аномального осмоса (об электроосмосе см. гл. V и IX).

Взаимодействие двух потоков в открытой системе описывается системой двух феноменологических уравнений:

$$\begin{aligned} I_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2, \\ I_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2. \end{aligned} \qquad (1.15)$$

Коэффициенты с однозначными индексами L_{11}, L_{22} характеризуют какой-либо один «чистый» процесс и могут быть коэффициентами теплопроводности, электропроводности, диффузии. Коэффициенты с неоднозначными индексами (L_{12}, L_{21}) называются феноменологическими коэффициентами. Феноменологические коэффициенты отражают процессы взаимодействия между собой необратимых процессов. К ним относятся коэффициенты термодиффузии, электроосмоса, термоэлектричества и т. д.

В 1931 г. Онзагер (Onsager) установил, что в области действия линейных феноменологических уравнений коэффициенты, отражающие взаимодействие процессов, равны между собой $L_{ik} = L_{ki}$ $(i,\ k = 1\ \ldots,\ n)$. Это равенство, получившее название соотношения взаимности Онзагера, показывает, что если поток, соответствующий необратимому процессу i, испытывает влияние силы X_k необратимого процесса k, то и поток процесса k также испытывает влияние силы X_i через посредство того же самого коэффициента L_{ik}. Значение этого принципа для всей термодинамики необратимых процессов очень велико.

На основании этого принципа И. Пригожин сформулировал и доказал основное свойство стационарного состояния, а именно то, что в *стационарном состоянии скорость возрастания энтропии* $\frac{dS_i}{dt}$, *обусловленная протеканием необратимых процессов, имеет положительное и минимальное из возможных значений.*

Рассмотрим приращение энтропии в замкнутой системе, состоящей из двух фаз с разной температурой. Между этими фазами происходит обмен теплом и веществом. При этом приращение энтропии, отнесенное к единице времени, можно записать в виде

уравнения:

$$T\frac{dS_i}{dt}=I_TX_T+I_MX_M>0, \qquad (1.16)$$

где I_T и I_M — потоки тепла и вещества соответственно,
X_T и X_M — градиенты температуры и концентрации.

Соответствующие феноменологические уравнения можно написать в форме:

$$\begin{aligned} I_T &= L_{11}X_T+L_{12}X_M, \\ I_M &= L_{21}X_T+L_{22}X_M. \end{aligned} \qquad (1.17)$$

Подставим значения I_T и I_M в уравнение (1.16) и используем соотношение взаимности Онзагера: $L_{12}=L_{21}$

$$T\frac{dS_i}{dt}=L_{11}X_T^2+2L_{21}X_TX_M+L_{22}X_M^2>0. \qquad (1.18)$$

Взяв производную от этого уравнения по X_M при постоянном X_T, получим при $T=\text{const}$:

$$\frac{\partial}{\partial X_M}\left(\frac{dS_i}{dt}\right)=2\left(L_{21}X_T+L_{22}X_M\right)=2I_M=0. \qquad (1.19)$$

Два условия $I_M=0$ и $\frac{\partial}{\partial X_M}\left(\frac{dS_i}{dt}\right)=0$ полностью эквивалентны, если только сохраняют силу линейные соотношения.

Поскольку величина $\frac{dS_i}{dt}$ для необратимых реакций всегда положительна, то условия экстремума, определенные уравнением (1.19), относятся к минимуму, что и требовалось доказать. Аналогичное доказательство может быть проведено и для открытой системы.

Таким образом, в стационарной неравновесной системе скорость возникновения энтропии или скорость рассеяния свободной энергии принимает минимально возможное при данных условиях положительное значение. Если система почему-либо отклонится от стационарного состояния, то в ней наступят внутренние изменения, которые будут стремиться приблизить систему к стационарному состоянию. Это обстоятельство имеет важное значение для того свойства стационарного состояния, которое можно назвать аутостабилизацией.

Свойство аутостабилизации представляет собой принцип Ле Шателье, расширенный и включающий в себя не только равновесные реакции, но и необратимые реакции в стационарном состоянии. Этот принцип, сформулированный для случая термодинамического равновесия, гласит: *Если система находится в состоянии равновесия, то при действии на нее сил, вызывающих нарушение равновесия, система приходит в такое состояние, в котором эффект внешнего воздействия ослабляется.* Например, при повышении температуры химическое стационарное равновесие смещается в сторону реакции, идущей с поглощением тепла, а при повыше-

нии давления — в сторону реакции, идущей с уменьшением объема; в обоих случаях конечные приросты температуры или давления будут меньше ожидаемых.

СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ И АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВА

Кинетический характер стационарного состояния обусловливает появление в открытой системе неравномерного распределения веществ по обе стороны границы системы. Так стационарный поток продуктов обмена через клеточную оболочку обязательно приводит к неравновесному распределению вещества, не участвующего непосредственно в процессе метаболизма. Это положение вытекает из теоретического анализа открытой системы, проведенного Пригожиным. Рассмотрим случай взаимодействия необратимых процессов в стационарном состоянии на примере взаимодействия диффузии с химической реакцией.

Фаза II	Фаза I	Фаза II
M ——	$\rightarrow M \rightarrow P$ ——	——$\rightarrow P$
O ——	$\rightarrow O$ ——	——$\rightarrow O$

Имеется открытая система (фаза I), которая получает вещество M из внешней среды (фаза II), превращает его в ходе химической реакции ввещество P, которое вновь диффундирует в окружающую среду. Кроме взаимодействующих веществ M и P в системе присутствует инертное вещество O, которое система получает извне, но не использует в реакции. Приращение энтропии в системе можно записать в соответствии с формулой (1.16):

$$T\,\frac{dS_i}{dt} = A_M\,\frac{dn_{e,\,M}}{dt} + A_P\,\frac{dn_{e,\,P}}{dt} + A_O\,\frac{dn_{e,\,O}}{dt} + A_{\text{хим}}V_{\text{хим}} > 0, \quad (1.20)$$

где A_M (и соответственно) A_P, A_O является сродством процессов переноса, аналогичным сродству химической реакции $A_{\text{хим}}$ (сродство относится к обобщенным силам). $\frac{dn_e}{dt}$ — количество молей вещества, перенесенного извне в систему, T — абсолютная температура, $V_{\text{хим}}$ — скорость химической реакции.

Система феноменологических уравнений, аналогичная (1.17), для данной системы будет иметь вид:

$$\begin{aligned}
\frac{dn_{e,\,M}}{dt} &= L_{11}\,\frac{A_M}{T} + L_{12}\,\frac{A_O}{T}\,, \\
\frac{dn_{e,\,O}}{dt} &= L_{21}\,\frac{A_M}{T} + L_{22}\,\frac{A_O}{T}\,, \\
\frac{dn_{e,\,P}}{dt} &= L_P\,\frac{A_P}{T}\,, \\
V_{\text{хим}} &= L_{\text{хим}}\,\frac{A_{\text{хим}}}{T}\,,
\end{aligned} \quad (1.21)$$

где L_{11}, L_{12}, L_{21}, L_{22}, L_P, $L_{хим}$ — коэффициенты.

По условиям задачи, инертное вещество O, не участвуя в химической реакции, взаимодействует с веществом M при переносе.

Стационарная концентрация вещества M определяется, по-видимому, разностью между количеством вещества, поступившим в систему, и количеством вещества, вступившим в химическую реакцию.

Стационарная концентрация вещества P, напротив, будет равна сумме количества вещества, проникшего в систему, и количества вещества, вступившего в реакцию. Учитывая условия стационарности, можно записать:

$$\frac{dn_M}{dt} = \frac{dn_{e,M}}{dt} - V_{хим} = 0, \tag{1.22}$$

$$\frac{dn_P}{dt} = \frac{dn_{e,P}}{dt} + V_{хим} = 0, \tag{1.23}$$

$$\frac{dn_O}{dt} = \frac{dn_{e,O}}{dt} = 0, \tag{1.24}$$

или

$$V_{хим} = \frac{dn_{e,M}}{dt} = -\frac{dn_{e,P}}{dt}; \quad \frac{dn_{e,O}}{dt} = 0. \tag{1.25}$$

Используя соотношение взаимности Онзагера ($L_{12} = L_{21}$), из уравнения (1.21) можно получить выражение для A_M, A_P, A_O:

$$A_M = \frac{V_{хим}}{L_{11} - \frac{L_{12}^2}{L_{22}}}; \quad A_P = -\frac{V_{хим}}{L_P};$$

$$A_O = -\frac{\frac{L_{21}}{L_{22}}}{L_{11} - \frac{L_{12}^2}{L_{22}}} \cdot V_{хим}. \tag{1.26}$$

Важнейшее следствие этого анализа состоит в том, что сродство для инертного вещества, не участвующего в химической реакции (A_O), становится функцией химической реакции (1.26). Иными словами, в стационарном состоянии все потоки веществ взаимосвязаны друг с другом.

Если обратиться к живой клетке, то установление взаимосопряженности означает взаимную связь биохимических реакций в клетке с процессами переноса, поступлением и удалением продуктов метаболизма.

Представим себе, что веществами M и P являются промежуточные продукты реакции окислительного фосфорилирования, а вещество O — это растворы $NaCl$ или KCl. В условиях стационарности перенос и распределение этих веществ зависит от скорости реакции фосфорилирования и соотношения коэффициентов

L_{11}, L_{12}, L_{21}, L_{22}. Коэффициенты L_{11} и L_{22} являются коэффициентами диффузии или переноса веществ M и P соответственно. Коэффициенты L_{12} и L_{21} отражают взаимодействие потоков веществ M и P при проникновении в клетку. Таким образом, протекание метаболических процессов в клетке может вызвать неравномерное распределение электролитов в клетке, несмотря на то, что электролиты могут не принимать непосредственного участия в метаболических процессах.

Более того, возникшая зависимость концентрационного градиента вещества O от скорости химической реакции определяется не только абсолютной величиной скорости и коэффициентов, но и знаком. Если величина сродства A_O имеет одинаковый знак со скоростью химической реакции, то это означает, что перенос вещества O происходит по градиенту, в противном случае этот процесс идет против градиента. Скорость обычной биохимической реакции является величиной положительной $V_{хим} > 0$. В этом случае знак A_O зависит от соотношения коэффициентов L_{11}, L_{12}, L_{21}, L_{22}. Если произведение $L_{11} \cdot L_{22} < L_{12}^2$, то знаки A_O и $V_{хим}$ положительны, т. е. движение вещества O идет по градиенту. В случае $L_{11} \cdot L_{22} > L_{12}^2$ вещество O будет переноситься против градиента.

Наблюдаемые в биологии явления активного транспорта ионов, аминокислот, сахаров, т. е. движение указанных веществ против градиента в свете разобранного примера уже не кажутся столь загадочными. Обращаясь к формуле (1.20), можно отметить, что несовпадение знака сродства и скорости химической реакции или скорости переноса у одного из членов означает отрицательный знак $\frac{dS_i}{dt}$ для этого процесса, хотя суммарная величина $\frac{dS_i}{dt}$ в соответствии со вторым законом термодинамики обязательно должна быть > 0.

Таким образом, движение против градиента связано с локальным уменьшением энтропии, но в рамках стационарной системы взаимосвязанные процессы, протекающие одновременно с противоградиентным процессом, не только компенсируют его, но и прирост положительной энтропии при их протекании значительно превышает создание отрицательной энтропии противоградиентного активного процесса. Доказывая принципиальную возможность возникновения активного транспорта веществ в открытой стационарной системе, термодинамика оставляет открытым вопрос о механизме активного транспорта, решение которого определяется опытом.

В настоящее время существует большое количество моделей активного транспорта неорганических ионов, аминокислот, сахаров. Однако имеется принципиальная трудность описания активного транспорта как результата непосредственного взаимодействия биохимических реакций в организме с диффузионным потоком вещества через клеточную мембрану.

Согласно Ярдецкому (O. Jardetzky, 1960), предположение о непосредственном сопряжении биохимических реакций с диффузией противоречит принципу Кюри, который гласит, что взаимодействие может иметь место лишь между потоками одного тензорного порядка. Поскольку диффузия является векторным процессом (тензор первого порядка), а химическая реакция — скаляр (тензор нулевого порядка), то в силу принципа Кюри, непосредственного взаимодействия между ними не должно быть.

В последнее время появились работы, в которых показано, что принцип Кюри справедлив лишь для изотропных систем. Поскольку любая биологическая система является анизотропной, то соблюдение принципа Кюри при описании переноса веществ в ней необязательно. Таким образом, решающее слово в вопросе о природе механизма активного транспорта принадлежит эксперименту.

ТЕРМОДИНАМИКА МЫШЦЫ

По своим механическим и термомеханическим свойствам живая покоящаяся мышца напоминает каучук. Ее модуль упругости равен 10 *кг/см*^{2} и при пассивном растяжении мышцы также, как при растяжении резины, выделяется тепло. В случае значительного растяжения мышца приобретает кристаллическую структуру.

Свободная энергия растянутой мышцы равна произведению силы натяжения f на величину удлинения Δl, и в соответствии с формулой (1.6) может быть записана как:

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S = f\Delta l, \qquad (1.27)$$

где f — сила натяжения,

Δl — величина удлинения.

При постоянной температуре и давлении сила натяжения будет определяться следующим образом (дифференцируем по ∂l уравненение (1.27):

$$f = \left(\frac{\partial F}{\partial l}\right)_{P,T} - T\left(\frac{\partial S}{\partial l}\right)_{P,T}, \qquad (1.28)$$

можно легко доказать, что:

$$\left(\frac{\partial S}{\partial l}\right)_{P,T} = \left(\frac{\partial f}{\partial \mathrm{T}}\right)_{l,P}$$

Значение этих уравнений заключается в том, что путем относительно простого измерения силы натяжения и ее зависимости от температуры в изометрических условиях можно получить изменение энтропии и внутренней энергии, соответствующих растяжению. Из последней формулы видно, что сокращение мышцы, как процесс, обратный растяжению, может определяться изменением либо внутренней энергии мышцы, либо энтропийными изменениями, либо изменением обеих величин одновременно.

Заранее можно сказать, что в идеальном каучуке, эластичность которого обусловлена беспорядочным тепловым движением молекулярных сегментов, сопротивление растяжению будет определяться уменьшением конфигурационной энтропии, сопровождающей переход от хаоса к упорядоченной структуре. При этом изменения внутренней энергии будут минимальны. С другой стороны,

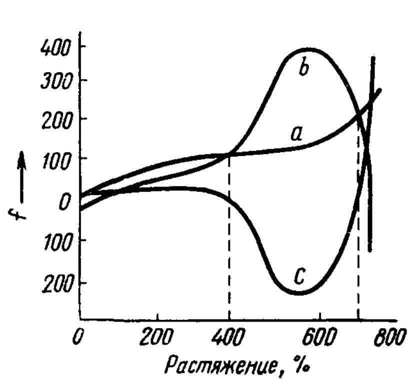


Рис. 10. Зависимость силы натяжения f (кривая a) и ее составляющих — энтропийного фактора (кривая b) и внутренней энергии (кривая c) от степени растяжения каучука

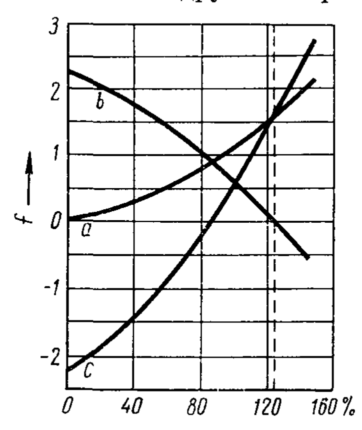


Рис. 11. Зависимость силы натяжения f (кривая a) и ее составляющих — энтропийного фактора (кривая b) и внутренней энергии (кривая c) от степени растяжения мышцы ligamentum nuclae

в стальной пружине, где кристаллическое расположение поддерживается фиксированным состоянием атомов железа, сопротивление растяжению будет связано с изменением, в первую очередь, внутренней энергии.

Сильно растянутый каучук, в котором наблюдается локальная кристаллизация, приобретает новые характерные черты. Процесс кристаллизации ориентирует макромолекулы даже в более значительной степени, чем механическое растяжение. При этом, естественно, энтропийный фактор $\left(\frac{\partial S}{\partial l}\right)_{P,\,T}$ будет уменьшаться. Одновременно в результате растяжения освобождается кристаллизационное тепло, что свидетельствует об изменении внутренней энергии. В растянутом полностью каучуке достигается состояние стальной пружины: макромолекулы растянуты и ориентированы так, что энтропия уже больше не изменяется, а основное сопротивление дальнейшему растяжению определяется внутренней энергией $\left(\frac{\partial U}{\partial l}\right)_{P,\,T}$. Подобное предположение было полностью подтверждено опытами Гата (E. Guth, 1947), результаты которых приведены на рис. 10, показывающем, что при рас-

тяжении от 0 до 380% каучук обладает обычными термоэластическими свойствами и натяжение определяется, в основном изменением энтропии. В области от 380 до 680% наблюдается частичная кристаллизация, при этом значительно изменяются и энтропия и внутренняя энергия. Далее, в области 680—800%, наблюдается сильная кристаллизация и натяжение определяется, в основном, лишь изменением внутренней энергии.

Если сравнить данные, полученные для каучука, с аналогичными данными для мышцы, то окажется, что в случае мышцы картина соответствует области сильного растяжения каучука со значительной долей кристаллизации (рис. 11).

Таким образом, проведенный термодинамический анализ свойства покоящейся расслабленной мышцы показал, что мышца в состоянии покоя имеет высокоорганизованную структуру, и это подтверждается также данными рентгеноструктурного анализа.

Сам механизм сокращения мышцы не может быть проанализирован при помощи термодинамики. Однако, основываясь на только что приведенных данных, можно предполагать, что сокращение должно сопровождаться одновременным изменением энтропийного фактора и внутренней энергии. Измерения Боттса показали, что как в актомиозиновых нитях, так и в целой мышце сокращение сопровождается изменением как внутренней энергии, так и энтропии.

А. Г. Пасынским и Блохиной было показано, что для портняжной мышцы задней ноги крысы в 0,25%-ном растворе АТФ, в температурном интервале 15—40° С доля энтропийного члена и деформации мышцы составляет 35—40%. Очевидно, при мышечной деформации происходит как изменение энергии взаимодействия между молекулярными цепями сократительных структур, так и изменение в упорядоченности этих структур или в их взаимодействии с веществами среды, что и проявляется в изменении энтропийного фактора. Природа этих изменений может быть установлена путем изучения структурных и биохимических изменений при мышечном сокращении.

ГЛАВА II

КИНЕТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Кинетика изучает закономерности протекания во времени и механизмы химических процессов. Скорость превращений веществ в клетках и тканях организма играет основную роль в регулировании нормального течения жизненного процесса. Организм представляет собой, как указывалось выше (см. стр. 14), открытую систему, обменивающуюся со средой энергией и веществом. Процессы обмена веществ в организме образуют сложную систему сопряженных реакций — последовательных, параллельных, замкнутых в циклы.

В биологических системах осуществляется принцип наиболее экономного расходования свободной энергии. Этим и определяется, какая из возможных реакций окажется превалирующей в тех или иных условиях. Важное значение при этом имеют кинетические условия протекания реакции. В живом организме скорость протекания реакции зависит главным образом от следующих условий: от наличия катализаторов — ферментов, от ингибиторов и от структурных условий развития реакции. В зависимости от всего этого биохимический процесс может протекать различными путями.

ТИПЫ РЕАКЦИЙ

Каждая элементарная реакция складывается из большого числа повторяющихся превращений исходных частиц — элементарных актов химического превращения. *Реакции, в элементарном акте которых участвуют одна, две или три частицы, называются соответственно мономолекулярными, биомолекулярными и тримолекулярными.*

К числу мономолекулярных относятся реакции внутримолекулярной перегруппировки, например, превращение *цис*-изомера в *транс*-изомер, а также некоторые реакции распада, например, распада хлористого этила на этилен и HCl:

$$CH_3-CH_2Cl \rightarrow CH_2=CH_2+HCl$$

В качестве примера биомолекулярной реакции, в элементарном акте которой участвуют две частицы, можно привести гидролиз иодистого метила:

$$CH_3I+OH^- \rightarrow CH_3OH+I^-$$

Реакция окисления окиси азота до двуокиси является тримолекулярной:

$$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$$

Вероятность одновременного столкновения более чем трех частиц чрезвычайно мала, поэтому реакции, в которых участвует более трех частиц, протекают, как правило, не в один акт, а в несколько элементарных стадий — моно-, би- и тримолекулярных.

Скорость реакции. *Важнейшей количественной характеристикой процесса химического превращения является скорость процесса, определяемая как возрастание или уменьшение во времени концентрации данного вещества.* В соответствии с кинетической теорией протекания химических реакций скорости зависят от концентрации реагирующих веществ и от температуры.

Согласно представлениям химической кинетики реакции происходят при столкновении молекул, а число столкновений при заданных внешних условиях (температура, давление, среда, в которой происходит процесс) является функцией концентрации реагирующих веществ. В результате реакции часть молекул исходных веществ расходуется на образование продуктов реакции; концентрация исходных веществ при этом убывает и скорость реакции падает. Именно поэтому химические реакции моно-, би- и тримолекулярные идут с непрерывно убывающей скоростью.

В мономолекулярной реакции типа $A \rightarrow P_1$ скорость накопления продукта P_1 выражается уравнением:

$$\frac{dP_1}{dt} = k_1 [A], \quad (2.1)$$

$$[A] = [A_0] e^{-k_1 t}, \quad (2.1а)$$

отсюда:

$$\frac{dP_1}{dt} = k_1 [A_0] e^{-k_1 t}. \quad (2.1б)$$

Здесь: $\frac{dP_1}{dt}$ — скорость реакции, т. е. изменение концентрации продукта P_1 во времени,

$[A_0]$ — начальная концентрация исходного вещества,

$[A]$ — концентрация исходного вещества в момент времени t,

k_1 — константа.

Если скорость реакции зависит от концентрации одного исходного вещества, то реакция называется рекцией первого порядка.

Для бимолекулярной реакции:

$$A + B \rightarrow P_2; \quad \frac{dP_2}{dt} = k_2 [A] [B], \quad (2.2)$$

где $[A]$ и $[B]$ — концентрации реагирующих веществ.

В этом случае скорость реакции определяется произведением концентраций двух веществ, и эта реакция называется реакцией второго порядка.

Как можно видеть из уравнений (2.1) и (2.2), в случае если $[A] = 1$ и $[B] = 1$, скорости реакций будут, соответственно, равны k_1 и k_2. Эти величины называются константами скорости.

Величина константы скорости определяется рядом факторов — вероятностью удачных столкновений, длиной пробега молекул, вязкостью среды и т. д. Эта величина является численным выражением реакционной способности молекул и может быть обозначена как *истинное число молекул, реагирующих в единицу времени при концентрации, равной единице* (1 *моль/л*).

Изучая зависимость скорости реакции от концентраций реагирующих веществ, можно сделать вывод о порядке реакции, т. е. судить о ее механизме. Это применимо как для отдельных реакций, так и для систем реакций. Сравнивая характеристики гипотетических и реальных систем реакций, можно анализировать особенности реальных систем, пути и кинетику реакций в организме.

Следует отметить, что понятия порядка и молекулярности реакции не всегда совпадают. Так, чисто бимолекулярные реакции подчиняются кинетике реакций первого порядка, если они идут в условиях избытка одного из реагирующих веществ. В этом случае скорость реакции зависит лишь от концентрации того вида молекул, которые находятся в меньшем количестве, так как убыль молекул второго вида не меняет существенно их концентрации, а следовательно, и скорости реакции. К числу таких реакций относятся реакции гидролиза в водной среде, например, кислотный гидролиз сахарозы.

Реакции мономолекулярные по мере расходования исходного вещества могут от кинетики первого порядка перейти к кинетике реакций второго порядка. Это зависит от того, что молекулы достигают нужной для распада энергии активации за счет удачных соударений:

$$A + A \rightarrow A^* + A.$$

Число соударений пропорционально A при больших концентрациях и пропорционально A^2 при малых концентрациях. Таким образом, при малых концентрациях скорость реакции становится пропорциональной квадрату концентрации.

Как уже упоминалось, скорость реакции, помимо концентрации, зависит от температуры. Известно, что с повышением температуры скорость химических реакций увеличивается. Раньше полагали, что это связано с увеличением числа соударений при нагревании. Однако подсчеты показывают, что если бы каждое соударение приводило к реакции, то скорости реакций должны

были бы в 10^2 — 10^6 раз превышать реально существующие скорости. Отсюда возникло представление, что лишь часть соударений приводит к осуществлению реакций. Чтобы произошло внедрение электронных орбит одной молекулы в электронные орбиты другой молекулы, чтобы произошло обобществление электронов, молекулы должны обладать определенной энергией, не ниже некоторого уровня E.

Были использованы представления статистической физики. Известно, что распределение молекул газа по скоростям а, следовательно, и по энергиям, описывается кривой Максвелла —

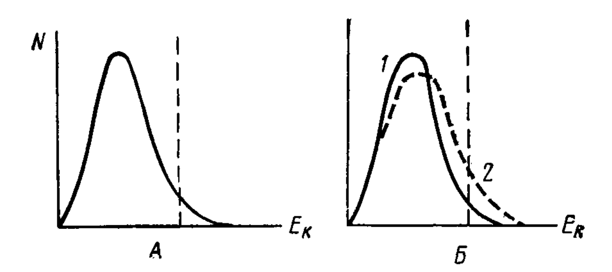


Рис. 12. Распределение молекул по энергиям: *1* — при Т = 273°; *2* — при Т = 373°: по оси абсцисс — кинетическая энергия молекул (E_k), по оси ординат — количество молекул, обладающих данной энергией (N). Объяснение см. в тексте

Больцмана. Доля молекул n_E, обладающих энергий E, в общем их числе n равна:

$$\frac{n_E}{n} = e^{-\frac{E}{RT}}. \qquad (2.3)$$

На рис. 12, *А* приведена кривая, показывающая распределение молекул по энергиям. Сопоставление реальных скоростей реакций с рассчитанными из теории соударений показало, что лишь часть молекул (на рисунке они расположены вправо от пунктирной линии), обладающих энергией, равной E и выше, способны вступать в реакции. Это так называемые «горячие молекулы».

С увеличением температуры вся кривая сдвигается вправо, число горячих молекул, способных вступить в реакцию, увеличивается, скорость реакции растет (рис. 12, *Б*).

Величина E характеризует способность молекул вступать в реакцию. Чтобы преодолеть барьер отталкивания между электронными оболочками, молекулы должны обладать большой кинетической энергией, не меньшей $E_{акт}$, называемой **энергией активации**. Поэтому величина E является очень важным кинетическим параметром, определяющим ход реакции.

Оказалось, однако, что при одинаковых концентрациях, температурах и энергиях активации скорости реакций могут отличаться. Следовательно, не каждое столкновение молекул, обладающих достаточным запасом энергии, приводит к реакции. Это связано с геометрической конфигурацией сталкивающихся молекул. Реакция идет лишь в том случае, если молекулы сталкиваются участками, в которых может произойти разрыв старых и образование новых химических связей. Чем больше молекулы, тем меньше вероятность удачного столкновения. У крупных молекул эта вероятность оценивается как 10^{-5}. Эту вероятность характеризуют с помощью так называемого стерического фактора p.

КИНЕТИКА СЛОЖНЫХ РЕАКЦИЙ

Для живого организма характерно, что протекающие в нем реакции идут обычно в несколько стадий — последовательных

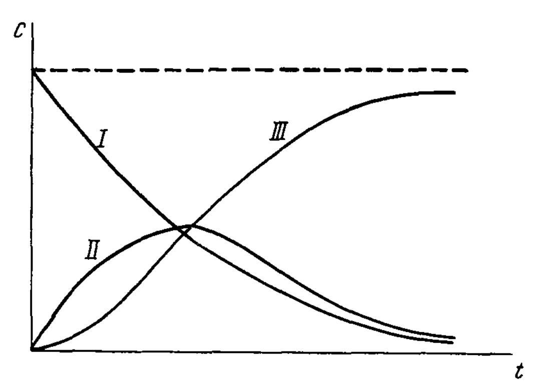


Рис. 13. Изменение количества вещества во времени в последовательной реакции: *I* — для исходного вещества *A*; *II* — для промежуточного вещества *B*; *III* — для конечного продукта *C*.

По оси абсцисс — время (t), по оси ординат — концентрация вещества (c)

и параллельных. Например, биологическое дегидрирование молочной кислоты идет следующим образом:

1) $CH_3-CHOH-COOH$ + кофермент I ⟶
⟶ $CH_3CO-COOH$ + восстановленный кофермент I

(Fe^{3+})

2) восстановленный кофермент I + ферритцитохром c ⟶

(Fe^{2+})

⟶ ферроцитохром c + кофермент I

3) ферроцитохром c + кислород ⟶ феррицитохром c + вода

Суммарная реакция: молочная кислота + кислород ⟶
⟶ пировиноградная кислота + вода

Рассмотрим простейшую цепь реакций:

$$A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C,$$

$$\frac{da}{dt} = k_1 a, \qquad (2.4а)$$

$$\frac{db}{dt} = k_1 a - k_2 b, \qquad (2.4б)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_2 b, \qquad (2.4в)$$

Графически изменения концентрации a, b и c во времени представлены на рис. 13.

Интересно рассмотреть некоторые частные предельные варианты для рассмотренной цепи реакций.

1) $k_1 \gg k_2$, т. е. быстрая первая фаза и медленная вторая. Обе фазы подчиняются кинетике первого порядка. Скорость суммарной реакции, т. е. накопление вещества C, определяется второй, медленно протекающей стадией реакции.

2) $k_2 \gg k_1$. Вещество B можно рассматривать как промежуточный нестойкий продукт, концентрация которого мала по сравнению с концентрациями a и c. Тогда $\frac{db}{dt}$ можно пренебречь, так как концентрация b мала и постоянна. Скорость накопления C определяется скоростью первой реакции, имеющей меньшую константу скорости.

Таким образом, в обоих случаях суммарная скорость процесса зависит от реакции, имеющей меньшую константу скорости. *Такая реакция, которая определяет суммарное течение процесса, называется определяющей.*

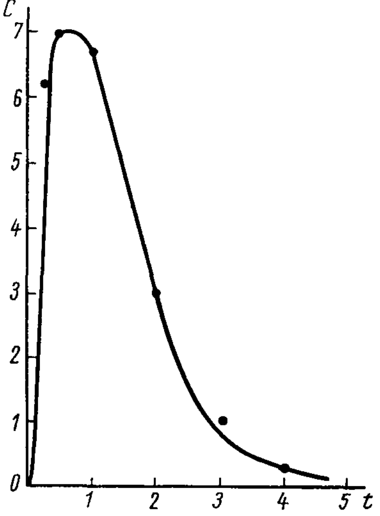


Рис. 14. Зависимость концентрации тромбина от времени. Сплошная кривая — вычисленная теоретически; точки — экспериментальные данные:

по оси абсцисс — время (t) в *мин*, по оси ординат — концентрация тромбина (c) в усл. ед.

В живом организме многие процессы следуют кинетике системы двух последовательных реакций первого порядка. Так, реакция: *протромбин → тромбин → комплекс тромбин — антитромбин* следует этой кинетике, и измеренное в опыте накопление промежуточного вещества (тромбина) совпадает с рассчитанным (рис. 14).

Скорость многих реакций в организме не зависит от концентрации реагирующих веществ и постоянна:

$$\frac{dc}{dt} = k_0. \qquad (2.5)$$

Такие реакции называются реакциями нулевого порядка. Кинетике нулевого порядка следуют, например, ферментативные реакции, идущие в условиях избытка субстрата. Это связано с тем, что в таких условиях весь фермент связан с субстратом и скорость реакции определяется скоростью распада фермент-субстратного комплекса, концентрация которого остается постоянной. В этом случае система $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_0} C$ состоит из реакций первого и нулевого порядка. Скорость образования продукта C не зависит от концентрации вещества A, т. е. суммарная реакция $A \rightarrow C$ является реакцией нулевого порядка. Это определяется, как уже говорилось, тем, что реакция идет в две стадии с образованием промежуточного продукта B, концентрация которого остается постоянной. Нулевой порядок не может иметь отдельная элементарная реакция, а лишь система реакций. Следовательно, если в организме какая-либо реакция имеет нулевой порядок, это значит, что она протекает, по крайней мере, в две стадии.

В открытых системах, помимо скоростей химических реакций, важную роль играют скорости поступления реагентов в систему и удаления продуктов из системы, т. е. процессы диффузии. Такой случай удобно рассмотреть на уже упоминавшейся выше (см. стр. 32) гидродинамической модели Бэртона (см. рис. 5). Пусть вещество A переходит из источника S в сток Z, не претерпевая в системе химических превращений:

$$\underset{a_S}{S} \xrightarrow{k_1} \Big| \rightarrow \underset{a}{A} - \Big| \xrightarrow{k_2} \underset{a_Z}{Z},$$

где a_S — концентрация вещества в источнике,
a_Z — концентрация вещества в стоке,
a — концентрация вещества в открытой системе,
k_1 и k_2 — константы переноса.

Пусть a_S и a_Z постоянны, $a_S > a_Z$, тогда, согласно (2.4б):

$$\frac{da}{dt} = k_1 (a_S - a) - k_2 (a - a_Z). \qquad (2.6а)$$

При решении этого уравнения получается следующее выражение для концентрации вещества a в системе:

$$a = \frac{k_1 a_S + k_2 a_Z}{k_1 + k_2} + \left(a_0 - \frac{k_1 a_S + k_2 a_Z}{k_1 + k_2}\right) e^{-(k_1+k_2)t}, \qquad (2.6б)$$

где a_0 — исходная концентрация вещества в системе,
t — время.

Член, содержащий a_0, меняется экспоненциально в зависимости от t, поэтому при достаточно большом $t (t = \infty)$ или при

$k_1 + k_2 > 5$ экспоненциальный член становится ничтожно малым и a — постоянно и не зависит от a_0 в системе. Таким образом, стационарная концентрация a не зависит от a_0, а зависит только от концентрации a в источнике (a_S) и стоке (a_Z) и констант диффузии.

Рассмотрим более сложный случай, когда в открытой системе помимо диффузии происходит химическая реакция $A \rightleftarrows B$.

$$\underset{a_s}{S} \xrightarrow{k_1} \underset{a}{A} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} \underset{b}{B} \xrightarrow{k_3} \underset{b_z}{Z}$$

Стационарные концентрации a и b не зависят от начальных концентраций A и B, постоянны, несмотря на постоянный перенос вещества через систему, а зависят только от констант скорости, констант переноса и a_S и b_Z. Например, стационарная концентрация a ($\bar{a}$) будет равна:

$$\bar{a} = \frac{k_2k_{-2}a_S + k_1k_3a_S + k_{-2}k_3b_Z}{k_1k_{-2} + k_1k_3 + k_2k_3}. \qquad (2.7)$$

Ряд веществ в организме может вступать в параллельно идущие реакции. Например, глюкоза может окисляться по гликолитическому пути и далее — в цикле Кребса, или войти в цикл гексозомонофосфата.

Рассмотрим простейшую систему параллельно протекающих реакций:

$$A \xrightarrow{k_1} B, \qquad A \xrightarrow{k_2} C$$

$$\frac{db}{dt} = k_1a \ (2.8а), \qquad \frac{dc}{dt} = k_2a \ (2.8б)$$

Полная убыль вещества A:

$$\frac{da}{dt} = k_1a + k_2a = (k_1 + k_2)\,a \qquad (2.8в)$$

$$\text{или } a = a_0e^{-(k_1+k_2)t}; \qquad (2.8г)$$

$$b = \frac{k_1}{k_1 + k_2}\,[1 - e^{-(k_1+k_2)t}], \qquad (2.8д)$$

$$c = \frac{k_2}{k_1 + k_2}\,[1 - e^{-(k_1+k_2)t}], \qquad (2.8е)$$

$$\text{т. е. } \frac{b}{c} = \frac{k_1}{k_2}, \qquad (2.8ж)$$

т. е. если две реакции первого порядка происходят одновременно, количества превращенного в каждой из них вещества относятся между собой, как константы их скоростей. В случае, если одна из параллельных реакций подчиняется нулевому порядку, то определяющее значение получает реакция первого порядка. Это связано с тем, что после некоторой критической концентрации *a* дальнейшее ее увеличение уже не влияет на скорость реакции, которая приобретает нулевой порядок, но увеличивает скорость реакции первого порядка.

Исходя из того, что при наличии двух параллельных реакций первого и нулевого порядка основное расходование исходного вещества происходит в реакции первого порядка, Хиншельвуд (C. Hinshelwood) сделал важный вывод об относительной роли различных реакций в организме. При малых концентрациях субстрата происходящие в нем ферментативные реакции можно считать реакциями первого порядка. Отношение количества метаболитов, обмен которых следует различными путями, в этом случае постоянно. При повышении концентрации субстрата насыщение фермента на одном пути может произойти раньше, и реакция будет следовать кинетике нулевого порядка. Тот путь, где наиболее полно сохраняются условия, при которых ферментативные реакции следуют кинетике первого порядка, приобретает наибольшее значение в процессах обмена веществ. Для параллельных реакций, следующих кинетике первого и нулевого порядка, можно привести следующий пример:

$$C_6H_5COOH + NH_2CH_2-COOH \xrightarrow{k_1} \text{Гиппуровая кислота}$$

Бензойная кислота

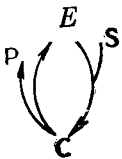
$$C_6H_5COOH + C_5H_9O_5-COOH \xrightarrow{k_2} \text{Глюкуронид}$$

Глюкуроновая кислота

При малых концентрациях C_6H_5COOH обе реакции являются реакциями первого порядка, но поскольку $k_1 > k_2$, в основном идет реакция с гликоколом, и в моче можно обнаружить только гиппуровую кислоту. При больших концентрациях бензойной кислоты первая реакция становится реакцией нулевого порядка, и при дальнейшем увеличении концентрации бензойная кислота выводится в виде глюкуронидов, образование которых остается реакцией первого порядка.

Важную роль в процессе обмена веществ играют различные циклы реакций. Наиболее характерным из них является цикл Кребса. Благодаря ему небольшие количества лимонной, яблочной и других органических кислот в организме могут катализировать окисление сотен граммов уксусной кислоты. Простейшей формой циклической реакции может служить ферментативная

реакция, в которой фермент многократно проходит через свободную и связанную форму.



В этой схеме *E* — фермент, *S* — субстрат, *C* — фермент-субстратный комплекс и *P* — продукт реакции.

В таком цикле одна молекула фермента обеспечивает превращение многих молекул субстрата. Существование циклов в организме можно рассматривать как приспособление к эффективному использованию метаболитов, доступных организму в малых количествах.

Наиболее поразителен пример с витаминами группы В, которые входят в состав коферментов и других акцепторов водорода. Суточная потребность человека в витаминах группы В такова: 1—2 *мг* тиамина и рибофлавина и 10—20 *мг* никотиновой кислоты. Соответствующие коферменты перерабатывают за сутки 400 *г* углеводов, 70—100 *г* жиров и 70—100 *г* белков, т. е. число молекул субстрата, измененных одной молекулой фермента в минуту, достигает очень больших величин — 10^3 — 10^6.

Скорость вращения циклов зависит от относительных концентраций веществ, составляющих отдельные стадии цикла, и тем больше, чем дальше эти отношения находятся от состояния равновесия. Отдельные циклы реакций связаны со всей сеткой обменных процессов с помощью тех веществ, которые проходят через цикл и претерпевают в нем необратимые превращения. Кроме того, и промежуточные вещества, входящие в состав цикла, могут не только образовываться в цикле, но и поступать в него извне. Благодаря этому организм может тонко регулировать концентрации реагирующих веществ в цикле, и тем самым скорость вращения цикла и интенсивность производимых циклом превращений. Например, скорость вращения цикла Кребса может увеличиваться за счет поступления добавочного количества уксусной кислоты, необратимо окисляющейся в нем. Такой же эффект может быть получен за счет добавочного поступления в цикл одного из промежуточных веществ — фумаровой кислоты, образующейся из аспарагиновой кислоты.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Согласно кинетической теории химических процессов скорости реакций зависят от концентрации реагирующих веществ и от температуры. Зависимость скорости реакции от температуры описы-

вается уравнением Аррениуса:

$$k = pZe^{-E_{\text{акт}}/RT}, \qquad (2.9)$$

где Z — число столкновений,
R — универсальная газовая постоянная,
$E_{\text{акт}}$ — энергия активации,
p — стерический фактор.

Это уравнение можно представить в логарифмической форме:

$$\ln k = \ln pZ - \frac{E_{\text{акт}}}{RT}. \qquad (2.9a)$$

Если построить график зависимости $\ln k$ от $\frac{1}{T}$, то $\operatorname{tg}\alpha = -\frac{E_{\text{акт}}}{R}$ (рис. 15).

Изучение температурных характеристик биологического процесса может дать ряд сведений о его механизме. Наиболее употребимой температурной характеристикой, наряду с энергией активации, является коэффициент Вант-Гоффа Q_{10}, характеризующий ускорение реакций при повышении температуры на 10°

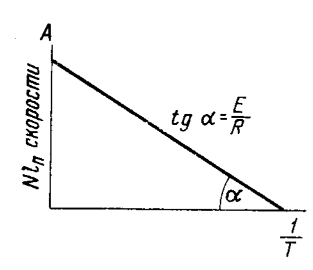


Рис. 15. Диаграмма Аррениуса:
по оси абсцисс — обратная температура $\left(\frac{1}{T}\right)$, по оси ординат — логарифм скорости реакции ($\ln K$)

$$Q_{10} = \frac{V_{T+10}}{V_T}. \qquad (2.10)$$

Реакции различной природы имеют разные энергии активации и, следовательно, по-разному зависят от температуры.

Химические реакции имеют энергии активации порядка нескольких десятков килокалорий на моль и Q_{10} для них, соответственно равен 2—3.

Энергия активации ферментативных реакций несколько ниже — порядка 4—12 *ккал/моль*, и Q_{10} меньше 2. Для фотохимических реакций, а также для физических процессов, например диффузии, энергия активации очень невелика и коэффициент Вант-Гоффа близок к единице. Таким образом, определяя в эксперименте Q_{10} или $E_{\text{акт}}$, мы можем судить о механизме процесса в целом или, по крайней мере, о природе определяющих реакций.

Энергии активации большинства биологических процессов того же порядка, что и для химических реакций. Они группируются в основном у трех величин — 8, 12 и 18 *ккал/моль*. Однако в процессах разрушения клеток различными токсическими факторами энергии активации очень велики — порядка 150 *ккал/моль*. Такая же высокая энергия активации характерна для реакций денатурации белка. Например, для свертывания гемоглобина — 60 *ккал/моль*, для гемолиза при действии горячей воды энергия

активации равна 64 *ккал/моль*, для бактериолиза *B. paratyphosus* в феноле — 48,6 *ккал/моль*.

Для ферментативных реакций характерны более низкие значения энергии активации. Согласно современным представлениям, ускорение реакции в присутствии ферментов связано с тем, что фермент образует комплекс с субстратом. При этом конфигурация электронного облака реагирующей молекулы изменяется так, что облегчается ее вступление в реакцию, и, следовательно, уменьшается энергия активации реакции. Например, энергия активации гидролиза сахарозы при действии амилазы равна 11 *ккал/моль*, а при действии кислот — 25,6 *ккал/моль*.

Для фотохимических процессов в клетках $E_{акт}$ очень низка, например 500—1000 *кал/моль* для процессов, протекающих в сетчатке глаза.

Энергия активации связана с коэффициентом Вант-Гоффа следующим соотношением:

$$E_{акт} = 0{,}46 T_1 \cdot T_2 \lg Q_{10}. \qquad (2.11)$$

Анализируя зависимость скорости биологических реакций от температуры, можно судить также о разделении процесса на отдельные стадии и о механизме этих стадий. Например, температурный коэффициент фотосинтеза колеблется от 1,2 до 2,5. Температурный анализ показал, что при малой интенсивности света $Q_{10} = 1{,}2$, а при большой — $Q_{10} = 2{,}5$. Это позволило констатировать, что скорость процесса может определяться либо первой, световой стадией процесса, либо второй, темновой реакцией Блекмана. Отсюда видно, что скорость процесса определяется находящейся в «минимуме» реакцией, которая представляет собой узкое место процесса. А. Ф. Самойлов установил, что процесс возбуждения в нерве имеет температурный коэффициент $\sim$1,7, т. е. величину, характерную для ферментативных реакций. Для проведения же возбуждения от концевых пластинок нерва к мышце получен коэффициент 2,5—2,7, характерный для химических процессов.

При изучении многих биологических процессов (ритма сокращений сердца, интенсивности люминесценции бактерий, сокращений колокола медузы, скорости дробления яиц морского ежа и др.) найдено удовлетворительное совпадение с законом Аррениуса для изменения скорости этих процессов с температурой в пределах температурного оптимума.

Удовлетворительное совпадение было найдено Аррениусом для реакции гемолиза эритроцитов аммиаком и гемолитическими ядами, для реакции разложения гемолизина и др. Это связано именно с тем, что несмотря на большую сложность протекающих в организме процессов, определяющую роль играет одна реакция.

В ряде случаев на кривой Аррениуса наблюдаются переломы (рис. 16). Это свидетельствует о том, что данная реакция является результатом развития двух или большего числа конкурирующих реакций, либо результатом последовательных реакций. Ведущая, определяющая реакция меняется с температурой, а точка пересечения двух прямых, точка перелома — та критическая точка, в которой одна ведущая реакция сменяется другой. Процессы, имеющие разные энергии активации, должны иметь и различную химическую природу, поэтому изучение температурных характеристик может служить методом определения ведущих реакций в живых функционирующих системах.

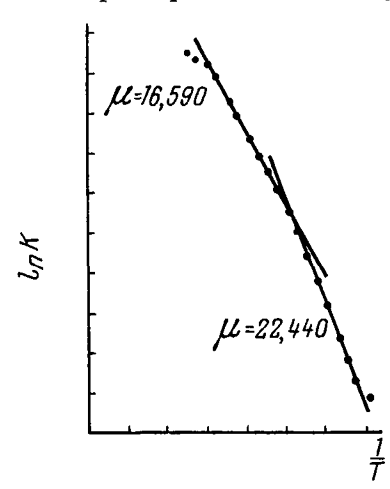


Рис. 16. Влияние температуры на люминесценцию *Bacterium phosphoricum* (по Крозье)

Возрастание скорости реакции при увеличении температуры происходит тем быстрее, чем больше энергия активации реакции. Поэтому, если процесс осуществляется конкурирующими реакциями, скорость которых по-разному зависит от температуры, при низких температурах основной выход продукта будет идти за счет реакции с малой энергией активации, а при повышении температуры будет возрастать роль реакции, имеющей бóльшую энергию активации. В случае последовательных реакций скорость суммарного процесса будет определяться скоростью наиболее медленно протекающей реакции. При низкой температуре более медленно протекающей реакцией может быть реакция с бóльшей энергией активации, а при повышении температуры — реакция с меньшей энергией активации.

Именно таким неравномерным ускорением реакций при изменении температуры Крозье (W. Crozier) объясняет наличие переломов на кривых температурной зависимости для биологических процессов — например, движения ресничек мерцательного эпителия. В этом случае в температурном интервале +15 — +30° С энергия активации равна 11 800 *кал/моль*, а при температуре ниже +15° С — 16 700 *кал/моль*. Для люминесценции *B. phosphoricum* E_1 и E_2 равны 16 590 и 22 400 *кал/моль* (см. рис. 16).

Необходимо отметить, что во всех случаях перелома характеристик экспериментальные данные совпадают с теоретически предсказанными. При повышении температуры после перелома наблюдается «снижение» энергии активации за счет того, что узким местом становится реакция с низкой энергией активации. Для

биологических процессов характерен общий ход температурной зависимости, подобный представленному на графике (см. рис. 17).

Начало, вершина и конец кривой соответствуют минимуму, оптимуму и максимуму температур, при которых идут биологические процессы. Некоторые исследователи высказывали мнение, что такой ход температурной зависимости является результатом сложения двух процессов, которые ускоряются с повышением температуры — реакции химического обмена и реакции разрушения структурных элементов. Энергия активации второй реакции выше, чем первой, и при более высоких температурах она начинает превалировать, приводя уже вторично к разрушению ферментов и замедлению реакций обмена:

$$w = A_1 e^{-E_1/RT} - A_2 e^{-E_2/RT}, \quad (2.12)$$

где w — скорость биологических реакций,

Однако это справедливо, по-видимому, для ограниченного ряда процессов, например для кривых температурного оптимума действия некоторых ферментов. В этом случае уменьшение активности фермента и замедление реакции действительно связано с денатурацией белка. Реакции денатурации белка определяют также верхний предел температур, при котором может существовать жизнь. Эти реакции имеют высокую энергию активации — 60 000—70 000 *кал/моль* и выше, а для таких реакций скорость резко изменяется в малом интервале температур, начиная с достаточно высокой температуры.

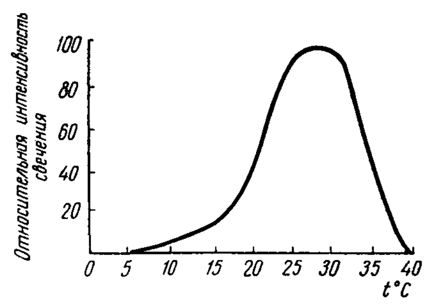


Рис. 17. Температурная зависимость свечения суспензии *Asotobacter fisheri*

Однако во многих случаях положение температурного оптимума и ниспадающей части кривой при повышении температуры лежит далеко от области температур, вызывающих денатурацию белка, например, у северных форм растений. Существование температурного оптимума определяется по-видимому несколькими обстоятельствами. Как уже говорилось, в процессе жизнедеятельности клеток и даже в отдельных его звеньях участвует много последовательных и параллельных реакций с различными энергиями активации. Стационарное состояние — т. е. стационарные концентрации веществ и определенное соотношение скоростей реакций — определяется соотношением констант скоростей реакций, которые по-разному зависят от температуры. По-видимому, не при всякой температуре может быть достигнута такая координация скоростей, которая привела бы к установлению стационарного состояния, это возможно лишь в определенной температурной зоне, которая и является зоной температурного оптимума.

До настоящего времени все сведения о скоростях реакций и их энергиях активации получают путем экспериментального изучения кинетики этих процессов. Расчетные методы позволяют лишь, зная, скорость данной реакции в одних условиях (температура, концентрация реагирующих веществ), вычислить ее скорость в других условиях, или вычислить скорость сходной с ней другой

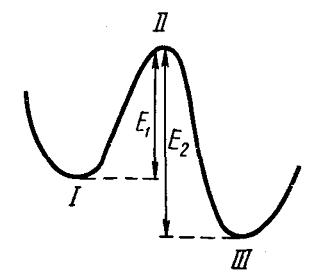


Рис. 18. Изменение энергии реакции. *I* — потенциальная энергия исходных молекул; *II* — потенциальная энергия активированного комплекса; *III* — потенциальная энергия молекул, образующихся в реакции: E_1 — энергия активации прямой реакции; E_2 — энергия активации обратной реакции

реакции. Таким образом, используя эти методы, можно рассчитывать лишь отношения скоростей или относительные значения скорости.

Большой принципиальный интерес представляет возможность расчета абсолютных скоростей реакций, т. е. возможность предсказать скорость реакции, исходя из свойств реагирующих молекул, их атомных и молекулярных (термодинамических) параметров не прибегая к кинетическим измерениям.

Метод активированного комплекса позволяет достигнуть некоторого прогресса в вычислении скоростей простых биохимических реакций. Обычно рассматривают процесс реакции как столкновение между активированными молекулами, приводящее к перегруппировке атомов в ходе реакции. Эта перегруппировка требует затраты энергии ΔH и при этом происходит изменение энтропии ΔS. Изменение потенциальной энергии, наблюдаемое во время простой реакции, показано на рис. 18. В каждом акте система атомов проходит через положение, соответствующее максимуму потенциальной энергии. Такое состояние представляет собой активированный комплекс. *Эта конфигурация, обладающая максимальной потенциальной энергией, определяет возможность превращения исходных веществ в конечные продукты реакции.* Система, содержащая активированный комплекс, находится в так называемом переходном состоянии.

Предполагается, что активированные комплексы находятся в равновесии с соответствующими реагентами, распадаясь с определенной скоростью, превращаются в продукты реакции. Условие равновесности позволяет формально использовать термодинамический аппарат для описания реакций, протекающих с обра-

зованием активированного комплекса. В настоящее время известно, что действие всех ферментов проходит через стадию промежуточного соединения с молекулой субстрата, которое осуществляется при участии различных сил — ковалентных, координационных, электростатических, водородных и других связей. Это промежуточное соединение аналогично активированному комплексу в теории переходного состояния.

Для вычисления константы скорости реакции концентрация активного комплекса, находящегося в равновесии с реагирующими молекулами при их концентрации равной единице, умножается на скорость, с которой комплекс пересекает энергетический барьер (II на рис. 18), и его потенциальная энергия падает до величины III. Константа скорости k равна:

$$k = K^* \frac{kT}{h}, \tag{2.13}$$

где K^* — константа равновесия между нормальными реагентами и активным комплексом,

$\frac{kT}{h}$ — частота, определяющая скорость прохождения активного комплекса через перевал в состояние III,

k — постоянная Больцмана, равная $1{,}37 \cdot 10^{-16}$ *эрг/град*,

h — постоянная Планка, равная $6{,}54 \cdot 10^{-27}$ *эрг/сек*,

T — абсолютная температура.

Константа равновесия между нормальными реагентами и активным комплексом (K^*) относится к изменению теплоты, свободной энергии и энтропии в реакции образования активированного комплекса точно таким же образом, как константа равновесия любой реакции относится к ее термодинамическим параметрам (см. формулы 1.7, 1.8, 1.9).

$$RT \ln K^* = T\Delta S^* - \Delta H^* = -\Delta Z^*, \tag{2.14}$$

где ΔS^*, ΔH^*, ΔZ^* соответственно энтропия, энтальпия и свободная энергия реакции, в которой активный комплекс образован из реагентов.

$$\Delta H^* = E - RT \tag{2.15}$$

или

$$\Delta H^* \cong E. \tag{2.16}$$

Объединяя (2.13) и (2.14) получим:

$$k = \frac{kT}{h} e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-\Delta H^*/RT}. \tag{2.17}$$

Исходя из (2.16):

$$e^{-\Delta H^*/RT} \cong e^{-E/RT}. \tag{2.18}$$

Следовательно:

$$\frac{kT}{h} \cdot e^{\Delta S^*/R} = pZ \tag{2.19}$$

и

$$p = e^{\Delta S^*/R}. \tag{2.20}$$

Таким образом, стерический фактор связан с изменением энтропии в реакции образования активированного комплекса. Скорость реакции зависит от изменения свободной энергии реакции активации. Ни изменение теплоты реакции (приближенно энергия активации по Аррениусу), ни изменение энтропии реакции не дают в отдельности правильной меры скорости реакции.

С помощью теории переходного состояния удалось объяснить чрезвычайно запутанную картину денатурации белка. Известно, что если нагреть белковый раствор или обработать его различными агентами (мочевина, спирт и др.), то белки претерпевают внутримолекулярные изменения, известные под названием денатурации. При этом наблюдается падение растворимости и возрастание вязкости. Тепловая денатурация белков обладает огромным температурным коэффициентом, который с точки зрения обычных кинетических представлений соответствует большой энергии активации. Однако эта величина энергии активации в действительности является кажущейся.

Энергия активации E связана с энтальпией активного комплекса простым соотношением и для обычных температур и нормального давления, их можно считать приблизительно равными (см. 2.16).

Было показано, что энергия активации, измеряемая в эксперименте, определяется изменением энтальпии активированного комплекса ΔH^*, которое может быть интерпретировано как число связей, которые необходимо разорвать для образования активированного комплекса, и изменением энтропии ΔS^*, характеризующим изменение степени упорядоченности системы при активации. В реакции денатурации пепсина было показано, что бóльшая часть кажущейся энергии активации, равная 45 000 *кал/моль*, связана с энтропийным фактором, т. е. с изменением упорядоченности системы, и лишь 18 300 *кал/моль* необходимо для разрыва молекулярных связей при активации пепсина.

Метод активированного комплекса может быть применен не только для гомогенных реакций, но и для вычисления скорости гетерогенных каталитических процессов.

РЕГУЛИРОВАНИЕ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИЙ В ОРГАНИЗМЕ

Совокупность линейных, разветвленных и циклических реакций образует в организме сложную систему связанных строго определенным образом реакций, которая и лежит в основе процессов обмена веществ. Это обеспечивает взаимосвязь всех процессов обмена и возможность их тонкого приспособления к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды организма. Например, образующаяся на одной из последних стадий гликолиза пировиноградная кислота может через аланин и родственные

аминокислоты войти в обмен аминокислот; через ацетилкоэнзим она может войти в цикл Кребса, а также участвовать в биосинтезе жирных кислот. Сопряжение реакций может происходить не только за счет вхождения одного и того же вещества в различные цепи реакций (так называемое стехиометрическое сопряжение). Возможно и энергетическое сопряжение циклов реакций. При биологическом окислении, например, выделяются большие количества энергии, необходимые для жизнедеятельности организма, которые удовлетворяют не только потребности организма в тепловой энергии, но и определяют возможность совершения работы — механической, осмотической, электрической. Для этого у организма есть только один путь: одновременно с освобождением энергии при биологическом окислении происходит ее локализация в организме в форме макроэргических связей, при помощи которых организм уже и совершает все виды полезной работы. Поэтому со всеми стадиями окисления — анаэробными и особенно аэробными — сопряжен процесс образования макроэргических связей. Механизм этого сопряжения окисления и фосфорилирования (окислительное фосфорилирование) остается еще неясным. Регулирующим фактором является отношение концентрации АДФ и неорганического фосфата к АТФ.

В организме нет ни одного вещества, которое не участвовало бы в общей сетке реакций. Вся сетка в целом представляет собой открытую систему, в которую все время поступают вещества из внешней среды, претерпевают в ней различные химические превращения и затем удаляются в виде конечных продуктов обмена во внешнюю среду.

Между двумя стадиями химических превращений может существовать несколько путей реакций. Например, от глюкозо-6-фосфата к 3-фосфорглицериновому альдегиду можно прийти как путем гликолиза, так и через пентозофосфатный цикл. Различные пути реакций обладают разной эффективностью. Количества вещества, образующиеся по каждому направлению реакций, относятся как константы скоростей этих реакций. Наибольшее значение приобретает тот путь, по которому реакция может развиваться в данных условиях с наибольшей скоростью. Это принцип наибольшей скорости реакции Хиншельвуда. Он имеет фундаментальное значение для определения направления химических превращений в сложных сопряженных системах реакций. Основной поток вещества идет через систему, которая по своей структуре, наличию более совершенных и эффективных катализаторов обеспечит наибольшую скорость химических превращений. Это положение имеет и важное эволюционное значение, так как на добиологической стадии развития именно принцип максимальной скорости реакции мог обеспечивать преимущество одних открытых систем над другими при условии, что ускорение реакций не снижает устойчивости и стабильности системы.

Кинетические закономерности реакций в открытых системах привлекаются некоторыми авторами к объяснению процессов дифференцировки и развития. Так, образование различных клеточных форм на эмбриональной стадии развития объясняется следующим образом. Вещества, поступающие из внешней среды X, могут вступать в два различные цикла $ABCD$ и $LMNO$, связанные между собой обратной связью через бимолекулярную реакцию Q (рис. 19). Продукты реакции выводятся во внешний резервуар I, W, Z. Есть два устойчивых решения такой системы:

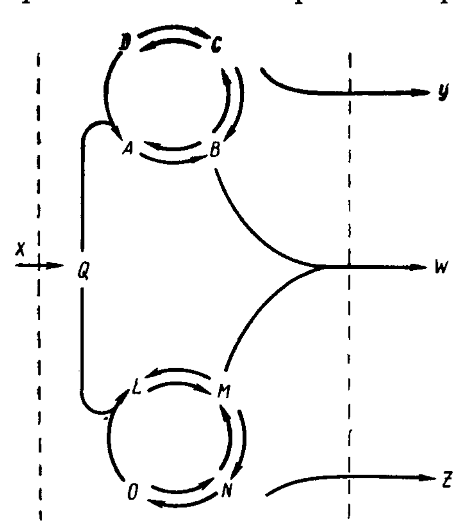


Рис. 19. Система с двумя устойчивыми состояниями: Q — бимолекулярная реакция, связывающая циклы $ABCD$ и $LMNO$.

Объяснение см. в тексте

1) $C_1 > 0$; $N_1 = 0$ и

2) $C_2 = 0$; $N > 0$,

где C_1 и N_1, C_2 и N_2 — концентрации веществ C и N.

Таким образом, реакция обычно идет по какому-либо одному пути. Незначительная добавка метаболита из второго цикла лишь незначительно и на время сдвинет стационарное состояние первого работающего цикла. Однако если эта добавка будет велика, то произойдет переключение реакции на второй цикл (рис. 20). В развивающейся яйцеклетке распределение вещества не везде одинаково, в ней должны быть концентрационные градиенты. И если возникнет градиент концентрации компоненты M, то зона критической концентрации определит границу двух областей, в одной из которых синтезируется C, а в другой N (рис. 21).

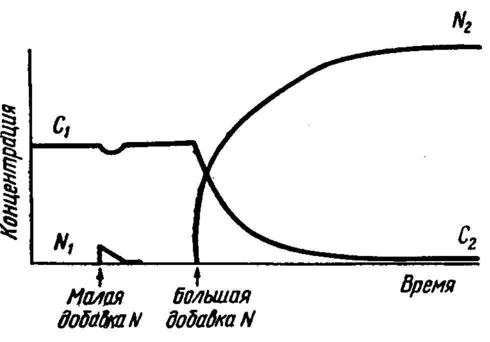


Рис. 20. Изменение концентраций веществ C и N при переключении циклов.

Объяснение см. в тексте

Такой кинетический подход позволяет по-новому объяснить сложные процессы дифференцировки.

Необходимо отметить также следующее: в закрытой системе в линейной цепи реакций $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ определяющей служила более медленная реакция (с меньшей константой скорости). В случае сетки реакций в организме ограничение общей скорости процесса может зависеть не от такой стадии, а от соотношения ряда констант скоростей. Поэтому задача достижения максимальной скорости процесса сводится не только к ускорению одной из стадий превращения, а заключается в установлении нового, наиболее эффективного в изменившихся условиях соотношения всех кинетических параметров процесса.

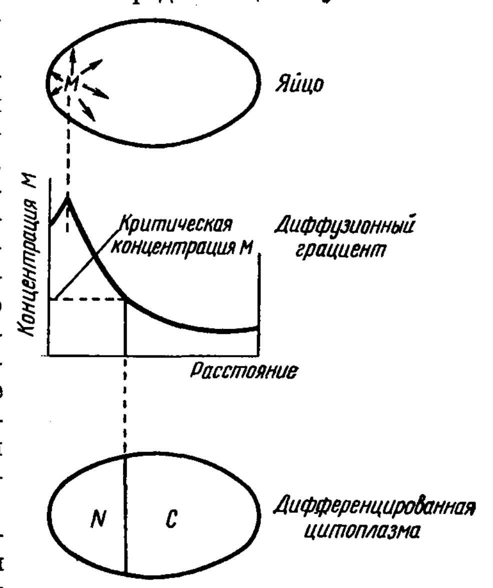


Рис. 21. Синтез различных веществ на эмбриональной стадии развития. Объяснение см. в тексте

Перераспределение кинетических параметров сетки реакций в организме может состоять не только в изменении концентрации ферментов и, следовательно, скоростей химических реакций, но и в соответствующем изменении внутриклеточных структур, их проницаемости, в изменении констант переноса и др.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ ОТКРЫТЫХ СИСТЕМ

Наиболее важным свойством сетки или цепей реакций в открытой системе является поддерживающееся во времени постоянным динамическое стационарное состояние, при котором для каждого компонента системы все процессы его поступления, удаления из системы и химического превращения в ней в совокупности компенсируют друг друга, вследствие чего концентрации всех компонентов поддерживаются на постоянном уровне, т. е. в системе

$$S \rightarrow A \rightleftharpoons B \rightleftharpoons C \;\ldots\; N \rightarrow L$$

$$\frac{da}{dt} = \frac{db}{dt} = \frac{dc}{dt} = \cdots\cdots \frac{dn}{dt} = 0 \qquad (2.21)$$

Интересно сравнить кинетические характеристики стационарного состояния в открытой системе с равновесным состоянием в замкнутой.

Если в системе идут химические реакции, то равновесное состояние замкнутой системы характеризуется равенством скоростей прямой и обратной элементарной реакций, а в открытой системе, находящейся в стационарном состоянии, скорость реакции

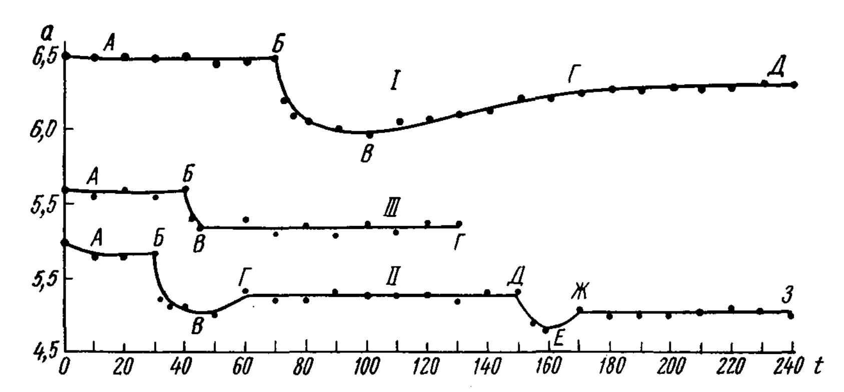


Рис. 22. Изменение стационарной концентрации аскорбиновой кислоты *a* при ее ферментативном окислении в условиях открытой системы: по оси абсцисс — время (*t*) в *мин*, по оси ординат — стационарная концентрация аскорбиновой кислоты (*a*). Объяснение см. в тексте.

в одном направлении закономерно больше скорости реакции в другом направлении, причем разность скоростей постоянна во времени.

Состав смеси при равновесии зависит от начальных концентраций веществ, а в стационарном состоянии не зависит.

Что произойдет с системой, находящейся в стационарном состоянии, при изменении внешних условий или констант каких-либо процессов?

Рассмотрим пример биохимической реакции в открытой системе, протекающей в условиях установившегося стационарного состояния. Примером может служить реакция ферментативного окисления аскорбиновой кислоты перекисью водорода в присутствии пероксидазы. Концентрации аскорбиновой кислоты 1,2%, перекиси водорода — 0,2%. Приток аскорбиновой кислоты в систему постоянен (10^{-5} *г/сек*), диффузионный перенос через мембрану в проточную воду $2 \cdot 10^{-6}$ *г/сек*, окисление в сосуде $3 \cdot 10^{-6}$ *г/сек*.

Происходящие в такой системе изменения представлены графически на рис. 22. Вначале устанавливается стационарная концентрация аскорбиновой кислоты *АБ*, затем, в момент времени *Б* в систему добавляется фермент — пероксидаза хрена. Фер-

мент разлагает перекись и, следовательно, увеличивает окисление аскорбиновой кислоты, уменьшая ее концентрацию в системе до уровня B. В соответствии с этим уменьшается выход аскорбиновой кислоты в проточную воду, меняется соотношение констант, и после промежуточного минимума система переходит к новому стационарному состоянию, близкому к исходному.

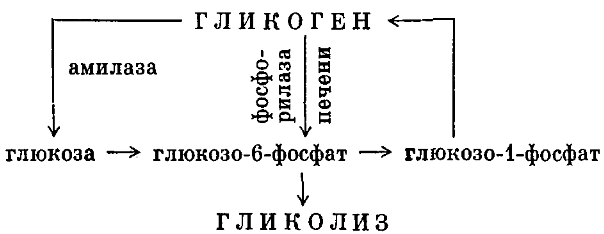
В общем случае для системы $S \xrightarrow{k_1} | \rightarrow A \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} B — | \xrightarrow{k_1} Z$ стационарные концентрации зависят от концентрации веществ во внешней среде, констант переноса и констант химических реакций, но не зависят от начальных концентраций A и B в системе. В этом заключается одно из существенных различий закрытой и открытой систем, так как равновесные концентрации веществ будут зависеть от исходных концентраций, в стационарном же состоянии концентрации за счет обмена с внешней средой будут одни и те же, независимо от исходного уровня. Это свойство, называется *эквифинальностью* системы.

Константа равновесия равна $k = \frac{k_{-1}}{k_1}$, где k_1 — скорость прямой реакции, k_{-1} — скорость обратной реакции. Это означает, что в замкнутой системе равновесные концентрации изменяются тогда, когда изменяются кинетические параметры. В открытой же системе стационарные концентрации могут изменяться и при изменении констант переноса, которые, следовательно, необходимо учитывать наряду с кинетическими параметрами системы. В закрытой системе добавление катализатора лишь ускорит достижение равновесия, но не изменит равновесных концентраций. В открытой же системе катализатор изменяет не только скорости реакции, но и стационарные концентрации, например в реакции ферментативного окисления аскорбиновой кислоты.

Как мы уже видели на гидродинамической модели и на реакции окисления аскорбиновой кислоты, для открытых систем характерна способность к самосохранению стационарного состояния. Повышение скорости реакции за счет действия катализатора или изменения температуры приводит к повышению концентрации продуктов реакции, но вследствие этого увеличивается их диффузионный перенос из системы, поэтому новая стационарная концентрация будет ближе к исходной, чем концентрация в замкнутой системе. При действии стимула, увеличивающего K_2, концентрация A уменьшается, но увеличивается его приток, концентрация B возрастает, но увеличивается его отток, и A и B при этом будут стремиться сохраниться на первоначальном уровне. После прекращения действия стимула K_2 возвращается к исходному уровню, и компенсирующие процессы действуют в обратном направлении. Эта аутостабилизация стационарного состояния может быть рассмотрена как распространение принципа Ле Шателье на открытые системы. Она лежит в основе

обратной связи, свойственной всем открытым системам, в том числе и живым организмам.

Например, при интенсивной работе или голодании, когда падает содержание глюкозы в крови, гликоген под действием амилазы превращается в глюкозу или под действием фосфорилазы печени в глюкозо-6-фосфат. Далее глюкозо-6-фосфат подвергается анаэробному окислению. Напротив, в условиях пониженного потребления энергии или избытка глюкозы глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат и далее полимеризуется в гликоген. Таким образом, интенсивностью окислительных процессов в организме определяется то, будет ли происходить расходование или накопление гликогена. Регулирующую роль при этом играет концентрация глюкозо-6-фосфата.



Регуляция уровня сахара в крови производится инсулином, изменяющим проницаемость мышечных и других клеток для сахара. Регуляция может осуществляться на уровне ЦНС, например, регуляция активности дыхательного центра с помощью концентрации CO_2 в альвеолах легких. Регулирующую роль может играть также пространственная организация.

Переход из одного состояния в другое может происходить по разным путям (см. стр. 33).

В сложных системах получаются и более сложные кривые перехода, имеющие более чем один максимум.

Таким образом, для открытых систем, находящихся в стационарном состоянии, характерен как ряд термодинамических особенностей (см. стр. 30), так и некоторые кинетические особенности. Так, принцип максимальной скорости реакции является определяющим в выборе альтернативных путей; катализаторы меняют не только скорость реакции, но и стационарные концентрации. Для открытых систем характерна динамическая аутостабилизация при изменении условий; переходы от одного стационарного состояния к другому имеют экстремальный характер.

Открытые системы обладают многими свойствами, характерными и для жизнедеятельности организмов. Правда, необходимо учесть, что теория открытых систем разработана пока лишь для наиболее простых систем, а организм — сложная совокупность многих открытых систем, находящихся по одним компонентам, например, уровню сахара или pH крови в стационарном состоя-

нии, а по другим — колеблющихся в широких пределах (например, по уровню молочной кислоты). Тем не менее возможно применение теории открытых систем к ряду частных и общих биологических и биохимических проблем. Вывод о том, что в открытой системе катализатор изменяет не только скорость реакции, но и стационарные концентрации, имеет большое значение для теории действия ферментов в живой клетке.

Большое биологическое значение имеют процессы динамической стабилизации открытых систем и их перехода из одного стационарного состояния в другое. Стационарные состояния в организме, переходя одно в другое, имеют общую необратимую направленность этих переходов (старение). Тем не менее некоторые состояния поддерживаются в организме с замечательной степенью устойчивости, например температура, pH крови и содержание сахара, воды и солей в крови. Это так называемые гомеостатические свойства.

Как смещение стационарного состояния можно рассматривать возбуждение живых клеток. При различных типах воздействия наблюдается изменение стационарного состояния, определяемое уже рассматривавшимися кривыми (см. рис. 6).

Как известно, система может переходить из одного стационарного состояния в другое, если изменение внешних условий и констант не превышает определенного предела.

При больших изменениях система уже не может вернуться к стационарному состоянию, ее способность к аутостабилизации нарушается. С этой точки зрения можно рассматривать действие на организм излучения, и по-видимому, других поражающих факторов. При малых дозах возникающие в организме процессы могут контролироваться, при больших же дозах установление нового стационарного состояния невозможно и происходит деградация системы.

ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СТАДИИ РЕАКЦИЙ В ОРГАНИЗМЕ

Для стационарного состояния незамкнутых систем чрезвычайно важно существование ступеней реакции, определяющих скорость всего процесса. В закрытых и в открытых системах роль определяющих будут играть разные реакции. Если в закрытой системе общую скорость процесса определяет более медленно идущая стадия, то в открытой системе в стационарном состоянии концентрации и константы скоростей принимают такие значения, что все реакции идут с одинаковыми скоростями. Поэтому определяющими могут стать реакции двух типов — необратимые реакции и реакции нулевого порядка. Как уже говорилось, реакциями нулевого порядка становятся ферментативные, состоящие из нескольких стадий реакции при повышении концен-

трации субстрата сверх некоторой критической величины, при которой достигается полное насыщение фермента субстратом.

Михаэлисом и Ментен (L. Michaelis a. M. Menthen) была изучена зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. Они предположили, что ферментативная реакция протекает путем образования промежуточного фермент-субстратного комплекса:

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} C+Z \xrightarrow{k_2} E+P.$$

Суммарная реакция: $S+Z \longrightarrow P$.

В этом случае скорость реакции будет лимитироваться, во-первых, скоростью образования комплекса и, во-вторых, скоростью разложения комплекса:

$$\left.\begin{aligned} \frac{ds}{dt} &= k_1(e-c)(s-c)-k_{-1}c, \\ \frac{dc}{dt} &= k_1(e-c)(s-c)-k_{-1}c-k_2zc, \\ v &= \frac{dz}{dt}=\frac{dp}{dt}=k_2zc. \end{aligned}\right\} \quad (2.22)$$

При увеличении концентрации скорость реакции приближается к максимуму, характерному для полного связывания фермента субстратом:

$$v_{\max}=k_2ze. \quad (2.22а)$$

Скорость ферментативной реакции выражается следующим образом:

$$v=\frac{v_{\max}\cdot s}{k_S+s}, \quad (2.23)$$

где k_S — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, s — концентрация субстрата, v_{max} — максимальная скорость реакции в условиях насыщения. При очень низких концентрациях s, когда $s \ll k_S$

$$v=\frac{v_{\max}\cdot s}{k_S}, \quad (2.23а)$$

т. е. скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата, реакция следует кинетике первого порядка.

При

$$s \gg k_S \quad v=v_{\max}, \quad (2.23б)$$

т. е. скорость реакции не зависит от концентрации субстрата, порядок реакции нулевой и она является определяющей в цепи реакций при условии насыщения фермента субстратом. Явления насыщения возможны и в других процессах, происходящих в организме. Формально уравнение Михаэлиса — Ментена тождественно изотерме адсорбции Ленгмюра

$$a=\frac{kP}{b+P}, \quad (2.24)$$

где a — количество адсорбированного вещества,
P — давление при равновесной концентрации,
b и k — константы.

Графически адсорбция вещества на носитель выражается такой же кривой, как и зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (рис. 23).

Если, например, происходит отравление клетки ядом, который поглощается сорбционно, то зависимость гибели от концентрации выражается уравнениями, аналогичными уравнению изотермы адсорбции. Так, по Оствальду (W. Ostwald), ядовитость раствора солей для ракообразных при повышении уровня концентрации сверх допустимого для жизни предела выражается формулой:

$$\frac{1}{t} = kc^n, \qquad (2.25)$$

где t — срок гибели,
c — концентрация,
k и n — константы ($n < 1$).

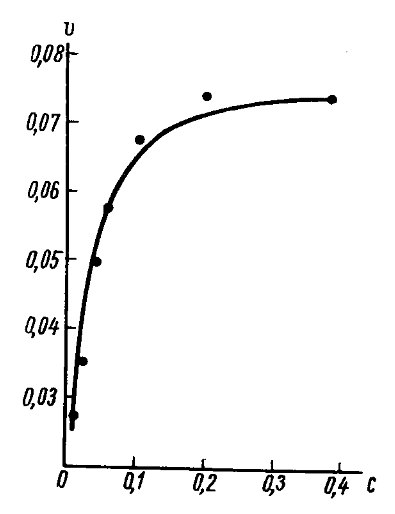


Рис. 23. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата на примере гидролиза сахарозы (в условн. ед.): по оси абсцисс — концентрация сахарозы (c), по оси ординат — скорость реакции (v)

В некоторых случаях уравнениями, аналогичными уравнению изотермы адсорбции, описываются явления переноса веществ в организме, например диффузия на носителе, когда исследуемое вещество проходит через мембрану только в виде комплекса с другим веществом. При низких концентрациях растворенного вещества носитель присутствует, главным образом, в свободном состоянии и количество образовавшегося комплекса приблизительно пропорционально концентрации свободного растворенного вещества, т. е. как и для простой диффузии, справедлив закон Фика (A. Fick). При высоких концентрациях все молекулы носителя оказываются связанными, наступает насыщение, сходное с тем, которое имеет место при адсорбции. В этих условиях увеличение градиента концентрации вещества не ускоряет его переноса через мембрану. В то же время это не противоречит закону Фика, так как перенос идет по градиенту концентрации комплекса: носитель + вещество.

Уиддасом (D. Widdass) было показано, что при высоких концентрациях скорость переноса глюкозы через плаценту овцы в довольно широких пределах не зависит от концентрации и градиента концентрации.

Таблица 1

Время, *мин*	Концентрация глюкозы		Разность концентраций	Величина, пропорциональная скорости переноса
	мать	плод		
30	528	185	343	0,0035
60	344	169	175	0,0030
90	280	150	130	0,0031
120	228	132	96	0,0032
150	183	113	70	0,0035
180	157	91	66	0,0046

Таким образом, перенос глюкозы через плаценту не может быть объяснен простой диффузией и находится в согласии с кинетическими закономерностями диффузии на носителе. Будучи реакцией нулевого порядка, как это имеет место в данном случае, перенос может стать определяющей стадией суммарного процесса.

Учение об определяющих стадиях может быть плодотворно использовано в ряде исследований. Например, если на всем пути химического превращения определяющей является одна реакция, то, исследуя ее зависимость от температуры, можно вычислить ее энергию активации и тем самым судить о ее природе.

АВТОКАТАЛИЗ И ЦЕПНЫЕ РЕАКЦИИ

Важную роль в некоторых процессах, происходящих в организме в норме и особенно при патологии и поражениях, играют реакции, в ходе которых образуются продукты, катализирующие данные реакции. *Если роль катализатора играют конечные продукты реакции, то такая реакция называется автокаталитической.*

$$A \xrightarrow{k} B$$

Скорость реакции зависит как от концентрации исходных, так и от концентрации конечных веществ.

$$\frac{db}{dt} = kab. \tag{2.26}$$

Процесс идет при переменной возрастающей концентрации катализатора. С увеличением количества молекул образующегося продукта скорость реакции растет, т. е. во времени скорость реакции повышается. Для автокаталитических реакций характерно, что в течение значительного промежутка времени, называемого индукционным периодом, выход продукта реакции

неизмеримо мал, а затем этот период сменяется быстрым развитием химического превращения[1].

$$Ce^{a_0 kt} = b\,(a_0 - b). \qquad (2.26а)$$

Примером автокаталитической реакции служит превращение пепсиногена в пепсин, где катализатором служит пепсин. Большинство реакций превращения проферментов в ферменты является автокаталитическими.

Наибольший интерес представляет группа так называемых цепных реакций, в которых катализ осуществляется не за счет конечных, а за счет промежуточных продуктов реакции. Предполагают, что такие реакции развиваются обычно в организмах при различных видах поражений, сопровождающихся разрушением биологической структуры, например, при действии излучений, некоторых ядов и др. Именно за счет цепных реакций происходит быстрое развитие процессов поражения в ответ на незначительные в энергетическом отношении повреждающие воздействия. Высказывают также предположения, что развитие ответных реакций на внешние воздействия происходит при участии цепных реакций.

Важным условием возникновения цепных реакций является начальная активация, т. е. возникновение активных соединений, имеющих неспаренные электроны. К числу частиц, имеющих неспаренные электроны, относятся свободные атомы ряда элементов, например H, N, O, атомы галоидов, атомы щелочных металлов. Они имеют один неспаренный *s*- или *p*-электрон, или несколько неспаренных *p*-электронов. Неспаренный *p*-электрон может находиться также у атома, входящего в состав многоатомной частицы. Такие частицы, так же, как и свободные атомы, обладают крайне высокой химической активностью, т. е. стремлением реализовать свою потенциальную возможность образовывать ковалентную связь. Они легко реагируют с другими молекулами, отрывая у них атомы или группы атомов. Кроме того, они могут реагировать друг с другом, образуя электронные пары (эта реакция называется рекомбинацией радикалов), и реагировать с материалом стенки реакционного сосуда, взаимодействуя с имеющимися там неспаренными электронами. В силу высокой реакционной способности этих частиц время жизни их невелико, оно измеряется долями секунды. Эти частицы не являются молекулами, т. е. частицами какого-либо вещества, а представляют собой фрагменты молекул, т. е. радикалы.

Некоторые свободные радикалы могут быть довольно устойчивыми, если неспаренный *p*-электрон образует единую устой-

---

[1] Сначала реакция идет с очень малой, но не с нулевой скоростью. Она идет либо за счет того, что возможна некатализируемая реакция, либо за счет присутствия в исходной смеси в ничтожных количествах конечного продукта — катализатора *B*.

чивую систему с *p*-электронами системы сопряженных связей молекулы. К числу таких радикалов относится трифенилметил. Стабильность радикалов может быть связана и со стерическим фактором, например, с тем, что атом, обладающий неспаренным электроном, сильно экранирован какими-либо заместителями, входящими в состав свободного радикала, как это имеет место у дифенилпикрилгидразила.

Характерной особенностью свободных радикалов является то, что вступая в реакцию с нейтральными молекулами, они, помимо образования конечного продукта, вызывают и образование (регенерацию) промежуточного активного продукта, т. е. нового свободного радикала, вступающего в реакцию со следующей молекулой, и т. д. Энергия активации цепных реакций, как правило, высока. Обычные реакции, имеющие высокую энергию активации, протекают медленно. При наличии же цепного механизма реакция развивается быстро, становится возможным осуществление реакций, которые при других условиях идти бы не могли.

Первичная активация, или зарождение цепей — образование свободных радикалов из валентнонасыщенных молекул, может быть результатом различных процессов. Например, цепная реакция $H_2 + Cl_2 \rightarrow 2HCl$ начинается с фотодиссоциации атома хлора: $Cl_2 + h\nu \rightarrow 2Cl^{\cdot}$. Образование свободных радикалов происходит при действии на субстрат электрического разряда, ионизирующего излучения. Например, при облучении воды имеют место следующие реакции:

$$H_2O \xrightarrow{-e} H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH^{\cdot}$$

$$H_2O \xrightarrow{+e} H_2O^- \rightarrow H^{\cdot} + OH^-$$

$$2OH^{\cdot} \rightarrow H_2O_2$$

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + {}^{\cdot}O^{\cdot} \text{ и т. д.}$$

Иногда образование радикалов происходит в результате удачных соударений, за счет которых энергия молекулы достигает высокого уровня. Например, в реакции крекинга этана образование радикалов происходит за счет мономолекулярного распада исходного вещества:

$$CH_3-CH_3 \rightarrow 2CH_3^{\cdot}$$

Образовавшиеся таким путем активные продукты — свободные радикалы — вступают в реакции, идущие с сохранением свободных радикалов и приводящие к расходованию исходных веществ и образованию продуктов реакции:

$$Cl^{\cdot} + H_2 \rightarrow HCl + H^{\cdot}$$

$$H^{\cdot} + Cl_2 \rightarrow HCl + Cl^{\cdot} \text{ и т. д.}$$

Как видно из этих уравнений, процесс состоит из повторения двух реакций. Взамен израсходованного радикала образуется новый радикал и происходит расходование H_2 и Cl_2 и накопление HCl.

Приведенные здесь реакции относятся к числу реакций с неразветвляющимися цепями — в каждом звене взамен одного истраченного радикала образуется один новый, количество радикалов не изменяется до тех пор, пока не начинает сказываться влияние обрыва цепей.

Обрывом цепей называются такие стадии цепного процесса, которые приводят к исчезновению свободных радикалов. Обрыв цепей может происходить в результате захвата свободных радикалов стенкой сосуда. Реакция обрыва цепей является в этом случае реакцией первого порядка относительно концентрации радикалов, т. е. зависит линейно от концентрации радикалов. Поэтому обрыв цепей на стенках реакционного сосуда называется линейным обрывом. При повышении концентрации радикалов повышается вероятность столкновения двух радикалов с образованием валентнонасыщенной молекулы и превращением избытка энергии в тепло. В этом случае скорость реакции обрыва пропорциональна квадрату концентрации свободных радикалов и называется квадратичным обрывом цепей. Поскольку в результате каждого элементарного акта гибнет два свободных радикала, то выражение для скорости гибели активных центров записывается:

$$w_2 = 2k_2n^2, \quad (2.27)$$

где n — концентрация активных центров,
k_2 — константа скорости процесса.

Итак, *цепной процесс можно разделить на несколько стадий: реакции зарождения цепи, реакции продолжения цепи и реакции обрыва цепи. Совокупность последовательных реакций, из многократного повторения которых состоит процесс, называется звеном цепи.*

Приведенные выше реакции образования хлористого водорода представляют собой звено цепи. Оно состоит из двух реакций, что характерно для большинства цепных процессов.

Число полных звеньев, приходящихся в среднем на один первоначально образовавшийся радикал, называется длиной цепи. Длина цепи определяется соотношением скоростей процессов обрыва и продолжения цепи. Существует некоторая вероятность обрыва цепи (β) на каждом звене цепи. Вероятность продолжения цепи равна $1 - \beta$. Вероятность того, что цепь будет иметь n звеньев и обрыв произойдет на $(n + 1)$ звене цепи равна:

$$w_n = (1 - \beta)^n \beta. \quad (2.28)$$

Средняя длина цепи равняется:

$$\nu=\frac{1-\beta}{\beta}, \tag{2.29}$$

т. е. она равна отношению вероятностей продолжения и обрыва цепи или, поскольку отношение вероятностей этих процессов равно отношению скоростей, то длина цепей равна отношению скоростей продолжения и обрыва цепей.

Длина цепей зависит в первую очередь от природы цепных реакций. Например, при окислении углеводородов длины цепей составляют несколько десятков или сотен звеньев. В реакции образвания HCl длины цепей могут достигать 10^6 звеньев. Длина цепи также сильно зависит от условий протекания реакции, например от размера и материала стенок реакционного сосуда, от температуры.

Скорость цепной реакции с неразветвляющимися цепями будет зависеть от соотношения количества образующихся центров и количества погибших центров:

$$\frac{dn}{dt}=n_0-gn, \tag{2.30}$$

где n_0 — количество образующихся центров,
g — скорость обрыва цепей.

Поскольку каждый акт зарождения цепи вызывает осуществление ν звеньев цепной реакции, то скорость неразветвленной цепной реакции равна произведению скорости зарождения цепей на длину цепи:

$$w=w_0\nu. \tag{2.31}$$

Из этого отношения вытекают характерные кинетические особенности цепных реакций:

1. Скорость неразветвленной цепной реакции может быть значительно увеличена воздействием малых добавок веществ, способных образовывать свободные радикалы, т. е. увеличивать w_0.

2. Скорость неразветвленной цепной реакции может быть значительно увеличена воздействием физических факторов, вызывающих образование свободных радикалов — света, ионизирующих излучений. При фотохимическом инициировании квантовый выход значительно больше единицы (на каждый поглощенный квант — 2 радикала, на каждый радикал большое число израсходованных молекул исходного вещества и образовавшихся молекул продукта). Высокий квантовый выход (число молекул продуктов на один поглощенный квант) — один из характерных признаков цепного механизма реакции.

3. Скорость цепных реакций может быть резко уменьшена добавлением в реакционную смесь малых количеств некоторых специальных веществ — и н г и б и т о р о в. Ингибиторы уве-

личивают скорость обрыва цепей, т. е. добавки ингибиторов снижают длину цепей ν. Торможение некаталитической реакции добавками ингибиторов является характерным признаком цепного механизма реакций. Обычно ингибиторами служат вещества, которые при столкновении с активным радикалом образуют малоактивные радикалы, неспособные дать продолжение цепи. Обычно эти радикалы ингибиторов гибнут в результате рекомбинации с каким-либо свободным радикалом.

$$RO_2^{\bullet} + NH(C_6H_5)_2 \longrightarrow ROOH + \dot{N}(C_6H_5)_2$$

Дифениламин

$^{\bullet}N(C_6H_5)_2$ — неактивный радикал с делокализованной свободной валентностью.

Такой обрыв цепей называется обрывом на молекулах ингибитора и является разновидностью линейного обрыва, поскольку линейно зависит от концентрации $R^{\bullet}$ или $RO_2^{\bullet}$.

Добавление одной части гидрохинона на 10 000 частей акролеина полностью подавляет окисление последнего. Бензойный альдегид, содержащий одну часть гидрохинона на 135 частей альдегида, за год поглощает столько же кислорода, сколько он в отсутствие гидрохинона поглощает за 1 минуту.

В некоторых цепных реакциях в каждом звене реакции на один прореагировавший и погибший радикал возникают два или больше радикалов. Такие реакции называются реакциями с разветвляющимися цепями. Классическим примером такой реакции является окисление H_2. Разветвление цепи происходит в реакции:

$$H^{\bullet} + O_2 \longrightarrow {}^{\bullet}OH + {}^{\bullet}O^{\bullet}$$

Одна цепь здесь как бы разветвляется на три. Таким образом, реакция окисления водорода состоит из следующих стадий:

$$H_2 + O_2 \longrightarrow H^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \quad \text{зарождение цепи}$$

$$H^{\bullet} + O_2 \longrightarrow {}^{\bullet}OH + {}^{\bullet}O^{\bullet} \quad \text{разветвление цепи}$$

$$\left.\begin{array}{l} {}^{\bullet}O^{\bullet} + H_2 \longrightarrow {}^{\bullet}OH + H^{\bullet} \\ OH^{\bullet} + H_2 \longrightarrow H_2O + H^{\bullet} \end{array}\right\} \text{продолжение цепи}$$

$$H^{\bullet} + \text{стенка} \longrightarrow {}^{1}/{}_{2}H_2 \quad \text{обрыв цепей на стенке}$$

$${}^{\bullet}H + O_2 + M \longrightarrow HO_2^{\bullet} + M \quad \text{обрыв цепей в объеме}$$

($HO_2^{\bullet}$ — малоактивный радикал)

Иногда к зарождению новых цепей приводят не свободные радикалы, а продукты цепной реакции, если они образуют радикалы легче, чем исходные вещества:

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

$$ROOH \longrightarrow RO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$$

В последней реакции происходит образование двух добавочных радикалов за счет распада О — О связи, или дополнительное зарождение цепей. Такое разветвление цепей называется вырожденным, и цепные реакции, включающие такие стадии, называются вырожденно-разветвленными цепными реакциями.

Нарастание числа свободных радикалов в цепной реакции может быть выражено уравнением:

$$\frac{dn}{dt} = w_0 + \varphi n, \qquad (2.32)$$

где w — скорость инициирования,

φ — разность скоростей разветвления и обрыва цепей, или $\varphi = f - g$;

тогда

$$\frac{dn}{dt} = w_0 - (g - f)\, n. \qquad (2.33)$$

Рассматривая это уравнение, можно вывести многие важнейшие черты разветвленных реакций. Оно получено для реакции окисления водорода, но может также служить модельным уравнением для многих цепных разветвленных реакций.

Если $g > f$, т. е. скорость обрыва больше, чем скорость разветвления, то в системе устанавливается стационарная концентрация радикалов:

$$n = \frac{w_0}{g - f}. \qquad (2.33а)$$

Наличие разветвления приводит лишь к тому, что эта стационарная концентрация выше, чем при отсутствии разветвления ($f = 0$), т. е. это эквивалентно некоторому уменьшению скорости обрыва. Кинетика реакции совпадает с кинетикой неразветвленных цепных реакций.

Если $f > g$, и $f - g > 0$, то при интегрировании уравнения получаем:

$$n = \frac{w_0}{\varphi}\left(e^{\varphi t - 1}\right), \qquad (2.33б)$$

или при:

$$\varphi t > 1,$$

$$n \approx \frac{w_0}{\varphi} \cdot e^{\varphi t}. \qquad (2.33в)$$

Как видно из уравнения, происходит прогрессивное нарастание концентрации свободных радикалов, а следовательно, и скорости цепной реакции. Через каждый промежуток времени, равный $1/\varphi$ секунды, концентрация n, а следовательно, и скорость, возрастают в e раз. Таким образом, за несколько интервалов, каждый из которых равен $1/\varphi$, практически полное отсутствие процесса сменяется его взрывным протеканием.

Одной из наиболее важных кинетических особенностей разветвленных окислительных цепных реакций является существование у них двух концентрационных пределов — верхнего и нижнего. Разветвленные реакции могут протекать лишь в определенном, часто довольно узком интервале концентраций. Как при очень низких, так и при очень высоких концентрациях кислорода эти реакции не идут. Это связано с тем, что в первом случае реакция прекращается за счет гибели активных радикалов на молекулах ингибитора, т. е. за счет линейного обрыва цепей. Во втором случае реакция прекращается в результате рекомбинации радикалов, накапливающихся в большом количестве в реакционной смеси, т. е. за счет квадратичного обрыва цепей. При этом изменение скорости реакции при концентрациях, близких к предельным, происходит не постепенно, а резко, скачкообразно.

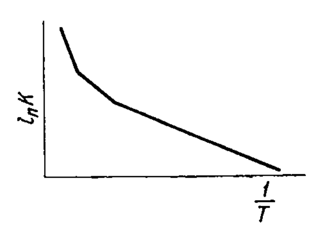


Рис. 24. Изменение энергии активации при цепной реакции с разветвленными цепями

Характерной особенностью реакции с разветвляющимися цепями является то, что она не подчиняется закону Аррениуса. С повышением температуры резко ускоряется процесс разветвления цепей и поэтому ускорение реакции при повышении температуры происходит быстрее, чем это следует из закона Аррениуса. Зависимость $\ln k$ от $1/T$ не выражается прямой линией (рис. 24). Энергия активации как бы растет с повышением температуры, однако это повышение является кажущимся.

Из формулы (2.33) видно, что реакции с разветвляющимися цепями продолжают развиваться с самоускорением и тогда, когда образование первичных центров приостанавливается. Квантовый выход цепных реакций очень высок, т. е. на одну начальную активированную молекулу приходятся тысячи и сотни тысяч вступающих в реакцию молекул.

Для биологов наибольший интерес представляет изучение закономерностей протекания цепных реакций с вырожденным разветвлением в жидкой фазе.

Реакции с вырожденным разветвлением идут более медленно, чем цепные разветвленные реакции, но они имеют с ними ряд общих черт (автоускорение, предельные явления). Во времени они так же, как и разветвленные реакции, развиваются по S-образной кривой. Если в разветвленной реакции ускорение в e раз происходит за доли секунды, то в вырожденно-разветвленных реакциях это время измеряется минутами и даже часами. Все реакции, у которых это время больше одной секунды, являются реакциями с вырожденным разветвлением. Реакции жидкофазного вырожденно-цепного окисления развиваются главным обра-

зом в углеводородах и жирах. Ряд кинетических особенностей некоторых реакций в организме говорит о том, что эти реакции развиваются по цепному механизму. С помощью цепных реакций можно объяснить мощное развитие биологических процессов в ответ на незначительные импульсы внешней среды. Например, поглощение ничтожной энергии при облучении ионизирующими излучениями вызывает летальный эффект.

В большинстве патологических случаев, при действии ионизирующих излучений, действии ядов индуцирование цепных реакций и быстрое развитие их во времени вызывает необратимое нарушение стационарного состояния.

Критерии, установленные школой Н. Н. Семенова для анализа цепных реакций, были использованы при анализе радиационных воздействий. Кинетический анализ процессов лучевого поражения показывает, что в основе их лежит развитие цепных процессов.

Наиболее вероятным субстратом для развития цепных реакций являются липиды, именно структурные липиды, из которых построены мембраны клеток, митохондрий, лизосом и которые играют важную роль в регулировании химических процессов в живых клетках.

Большое значение для понимания кинетических особенностей реакций, индуцируемых облучением в биолипидах, имело обнаружение в них незначительных количеств перекисных соединений. После облучения ионизирующей радиацией содержание этих перекисных продуктов сначала резко возрастает. Затем в процессе развития лучевого поражения их концентрация падает — в соответствии с кривой изменения концентрации промежуточных продуктов в цепной реакции.

К числу доказательств важной роли цепного окисления липидов в лучевом поражении относится обнаружение продуктов радикальной и перекисной природы в тканях облученных животных.

Реакции лучевого поражения сильно зависят от температуры. Энергия активации бывает у этих реакций порядка 20 000—50 000 *кал/моль*. При понижении температуры до +2 —4° С у низших организмов можно приостановить развитие лучевого поражения. Важным свидетельством того, что реакции лучевого поражения имеют цепной характер, является защитное действие некоторых специфических ингибиторов радикальных процессов (Н. М. Эмануэль и др.). Более подробное описание роли цепных реакций в развитии лучевого поражения будет приведено в главе XII.

Интересные кинетические особенности проявляются в реакциях, связанных с явлениями иммунитета у животных. Они были подробно изучены еще Аррениусом, а также многими современными исследователями. Эти реакции характеризует непропорцио-

нально большой выход конечного продукта — антител, в ответ на введение небольших количеств антигена, на чем основан метод профилактических прививок. Так, при инъекции человеку 0,36 *мкг* дифтерийного анатоксина в его крови образуется 1 000 000 молекул антител на одну молекулу антигена. Для реакции образования антител при введении антигенов было обнаружено наличие инкубационного периода длительностью от трех дней до трех-четырех недель. Установлено, что в течение латентного периода антитела отсутствуют как в крови, так и в тканях, где они образуются. Предполагали, что в латентный период может происходить синтез белковых предшественников антител. Однако при введении животным во время латентного периода глицина — C^{14} оказалось, что накопление его в антителах незначительно. По-видимому, антитела образуются целиком из материала реципиента после окончания латентного периода.

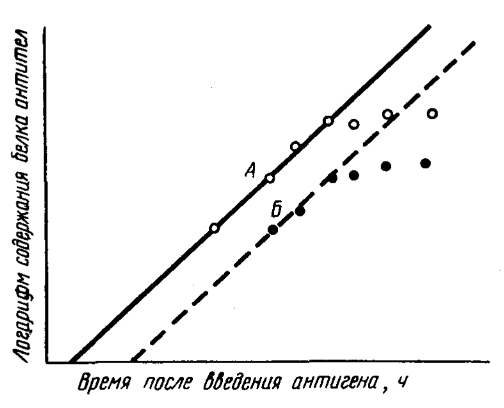


Рис. 25. Нарастание содержания антител после повторной иммунизации кролика сывороточным альбумином человека (*А*) и лошади (*Б*):

по оси абсцисс — время после введения антигена (в часах), по оси ординат — логарифм содержания белка антител

За латентным периодом следует экспоненциальная фаза нарастания антител, которая сменяется торможением их синтеза (рис. 25). Механизм торможения биосинтеза антител пока неясен, однако если бы его не происходило, то через двое суток количество антител было бы равно всему количеству сывороточных белков, а через четверо суток превышало бы общее содержание белков в организме.

При изучении реакции антигена с антителом было показано, что во времени она протекает как реакция первого и второго порядка (табл. 2).

Для мономолекулярных реакций $qt = \text{const}$. Таким образом, вышеприведенная реакция агглютинации *B. coli* имеет первый порядок.

Исчезновение антител из крови можно разделить на две стадии: I — быструю и II — медленную. По данным Бомштейна (по Аррениусу), исчезновение дифтерийного антитоксина из крови собаки выражается уравнением: $\log n = a - bt$, т. е. следует кинетике реакции первого порядка. Однако в первые сроки после максимального накопления антитоксина (при активной иммунизации) или его введения (при пассивной иммунизации) исчезно-

Таблица 2

Агглютинирующее действие агглютинина на *B. coli*

Количество агглютинина q	Время, необходимое для завершения реакции агглютинации t	qt
3,5	30	105
2,5	45	111
1,7	60	102
1,2	90	108
0,8	120	96
0,5	130	90
0,4	240	96
0,27	360	97

вение его идет ненормально быстро. Аррениус высказал предположение, что здесь наряду с реакцией первого порядка идет также процесс со сложной кинетикой. Эта стадия быстрого образования и разрушения антител не была точно классифицирована и лишь позднее исследователи определили ее как реакцию первого порядка. Однако при определенных условиях цепные реакции могут следовать кинетике реакций простых типов. Как указывает Н. Н. Семенов, на кривой, отражающей сложный процесс, можно выделить участки, на которых зависимость концентрации от времени является логарифмической, характерной для реакций первого порядка. Тем не менее при этом весь процесс не может быть отнесен к числу мономолекулярных.

Были проведены интересные наблюдения относительно кинетики убывания антител у людей, перенесших бактериальные инфекции. В самые последние сроки убывание замедляется. Возможно, что какое-то количество антител сохраняется в различных частях организма, а затем медленно диффундирует в кровь. При повторных введениях токсина уже иммунизированным животным инкубационный период реакции образования антитоксина сокращается или исчезает, а количество образующихся антител и продолжительность их образования увеличивается. При этом доказано, что происходит биосинтез новых антител, а не выбрасывание резервных в ответ на повторное введение антигена. Это явление напоминает ускоренное развитие цепной реакции под действием промежуточных активных продуктов или при добавлении веществ-инициаторов. Пожизненная иммунизация людей после кори, скарлатины и некоторых других болезней зависит, возможно, от сохранения некоторых количеств антитоксина или каких-то промежуточных продуктов в крови.

Таким образом, некоторые кинетические характеристики процесса иммунизации напоминают те закономерности, которые характерны для развития цепной реакции, а именно:

1. Непропорционально большой выход антител. В кровяное русло выбрасывается такое их количество, которое может обезвредить в сотни раз большее количество антигена, чем введенное в организм.

2. Инкубационный период от 3 до 5 дней.

3. Скорость появления антител выражается S-образной кривой.

4. Температурная характеристика процесса 40 000 *кал/моль*.

5. При вторичном введении антигена или токсина нет инкубационного периода. Хотя антитела не активируют эту реакцию, и, следовательно, ее нельзя назвать автокаталитической, по-видимому, в крови после первого введения остаются какие-то факторы, которые ускоряют образование антител при вторичном введении антигена. По-видимому, катализ реакции осуществляется промежуточными продуктами.

Подобные же кинетические закономерности наблюдаются при действии той группы ядов, которые называют протоплазматическими, например, рицин, яды змей, иприт, льюизит. Это наиболее сильные яды, действующие в ничтожно малых концентрациях. Здесь также имеется инкубационный период, самоускоренное развитие реакции и высокий Q_{10}; кроме того, Эмануэлем обнаружено ингибирующее действие пропилгаллата на яд кобры.

Таким образом, развитие ряда процессов в организме, в том числе некоторых патологических процессов, по своим кинетическим характеристикам напоминает протекание цепных реакций с разветвляющимися цепями.

ГЛАВА III

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

ПОНЯТИЕ О СВОБОДНЫХ РАДИКАЛАХ

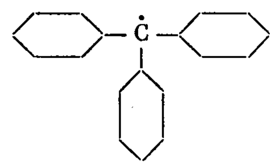
В настоящее время можно считать твердо установленным, что большинство химических и биохимических реакций в организме протекает при участии валентно-ненасыщенных осколков молекул — свободных радикалов и атомов, обладающих рядом весьма интересных специфических свойств и прежде всего — исключительно высокой химической активностью.

Одно из наиболее общих определений, которое можно дать понятию свободного радикала, состоит в следующем: *свободный радикал — это молекула или ее часть, имеющая неспаренный электрон на молекулярной или на внешней атомной орбите*. Присутствие такого электрона наделяет систему двумя характерными свойствами: очень высокой реакционной способностью в химических превращениях и наличием магнитного момента, обусловленного нескомпенсированным спином неспаренного электрона (см. стр. 90). Следует заметить, что имеется прямое тождество между понятием «свободная валентность» атома или радикала (т. е. числом присоединяемых им одновалентных атомов, например водорода или фтора) и числом неспаренных электронов с некомпенсированными магнитными моментами. Различают свободные радикалы — группы атомов, связанных химическими связями, обладающие одним (монорадикал) или двумя (бирадикал) неспаренными электронами. Примерами монорадикалов могут быть: —OH (свободный гидроксил), $—CH_3$ (свободный метил), $—C_2H_5$ (свободный этил) и др. Черточкой обычно обозначается обусловленное неспаренным электроном наличие свободной валентности (иногда то же обозначают точкой, например, $\dot{O}H$). Простейшим веществом, основное состояние которого бирадикально, является например, кислород; его молекула обладает двумя неспаренными электронами с параллельными спинами: $\dot{O} — \dot{O}$.

Свободные радикалы могут быть нейтральными и заряженными (ион-радикалы). Отрицательно или положительно заряженные свободные радикалы, называемые соответственно анион-

или катион-радикалами, образуются в процессах одноэлектронного окисления и восстановления.

Наряду с активными, метастабильными в обычных условиях свободными радикалами, известны органические радикалы, стабильные при комнатной температуре. Энергия разрыва связи молекулы, образованной из двух таких радикалов, очень низка. Для этих радикалов характерно наличие в их составе ароматических колец: например трифенилметил, который и был первым открытым органическим свободным радикалом.



Трифенилметил

С большинством радикалов исследователь сталкивается только как с короткоживущими промежуточными продуктами, образующимися в ходе радикальных химических реакций. Нестабильность радикалов обусловлена прежде всего энергетической выгодностью их рекомбинации, в результате которой образуется непарамагнитная молекула, например: $\dot{C}H_3 + \dot{C}H_3 \rightarrow C_2H_6$. Другая причина нестабильности наиболее активных радикалов — большая реакционная способность их по отношению к молекулам. Наиболее типичными при этом для свободных радикалов являются реакции замещения (3.1), присоединения и распада (3.2), изомеризации (3.3), рекомбинации (3.4) и диспропорционирования (3.5):

$$\dot{R}_1 + R_2 - R_3 \rightarrow R_1 - R_2 + \dot{R}_3, \qquad (3.1)$$

$$\dot{R} + A_1 = A_2 \rightarrow R - A_1 - \dot{A}_2, \qquad (3.2)$$

$$CH_3 - CH_2 - \dot{C}H_2 \rightarrow CH_3 - \dot{C}H - CH_3, \qquad (3.3)$$

$$\dot{R}_1 + \dot{R}_2 \rightarrow R_1 - R_2, \qquad (3.4)$$

$$2R - CH_2 - \dot{C}H_2 \rightarrow R - CH = CH_2 + R - CH_2 - CH_3. \qquad (3.5)$$

Частным случаем реакций (3.2) являются реакции полимеризации (3.6):

$$\dot{R} + A_1 = A_2 \rightarrow RA_1 - \dot{A}_2, \quad RA_1 - \dot{A}_2 + A_3 = A_4 \rightarrow \rightarrow RA_1 - A_2 - A_3 - \dot{A}_4 \text{ и т. д.} \qquad (3.6)$$

Наиболее важная мера реакционной способности радикалов — энергия активации (см. стр. 51) соответствующего элементарного процесса. Так, для реакций радикального замещения энергия

активации может составлять всего несколько *ккал/моль*; еще ниже энергия активации реакций, т. е. реакций захвата радикала ненасыщенной молекулой (3.2).

Роль радикалов как промежуточных частиц особенно велика в радикальных цепных неразветвленных реакциях (например, процессы полимеризации) и разветвленных реакциях (главным образом, процессы окисления).

Образование радикалов — один из путей превращения молекул при радиационно-химических и фотохимических воздействиях на вещество. В результате облучения вещества, когда подвижность «заморожена» (при низких температурах), а реакции свободных радикалов с соседними молекулами достаточно медленны, в таких объектах могут быть накоплены концентрации свободных радикалов, соответствующие 10^{19} — 10^{20} разорванных химических связей в одном кубическом сантиметре. При повышении температуры таких объектов радикалы обычно рекомбинируют и пропадают.

Свободные радикалы играют большую роль в гетерогенном катализе, в реакциях горения и взрыва, в важнейших промышленных процессах пиролиза, крекинга и полимеризации. Как мы увидим в дальнейшем, им принадлежит немаловажное место в разнообразных биологических процессах.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Обнаружение и регистрацию свободных радикалов осуществляют либо химическими, либо физическими методами исследования. Регистрацию радикалов химическими методами обычно проводят количественно с помощью изучения кинетики реакций, и таким способом получают точные сведения энергий активации. Огромный толчок развитию науки о свободных радикалах дали исследования советского ученого, академика Н. Н. Семенова, создавшего в конце 20-х годов теорию цепных реакций. Эта теория, позволившая объяснить в рамках единой и стройной концепции ряд непонятных химических явлений, привела ее автора к необходимому заключению о ведущей роли свободных радикалов как носителей цепи в подавляющем большинстве цепных процессов.

В основе стандартных химических методов обнаружения свободных радикалов лежит необычайно высокая химическая реакционная способность и идентификация конечных продуктов, образующихся в результате реакций радикалов. Так, Панет (G. Panet) разработал прямой количественный способ определения высокой химической активности, основанный на применении металлических зеркал, нанесенных на внутреннюю поверхность стеклянной трубки. Свободные радикалы реагируют с металли-

ческой пленкой, давая таким образом прямое доказательство своего присутствия. Природа радикалов в этих случаях может быть установлена с помощью анализа образующихся конечных продуктов. Метод «зеркал» нашел широкое применение для изучения радикалов в газовой фазе. Однако для определения радикалов в конденсированной фазе он совершенно неприменим. В этом случае используют другие методы регистрации радикалов, например исследование цепных реакций полимеризации, протекающих в присутствии свободных радикалов, образующихся из катализаторов.

Простейший физический метод, с помощью которого можно обнаружить свободные радикалы, точнее магнитные моменты неспаренных электронов,— прямое измерение магнитной восприимчивости образца. Присутствующие в системе свободные радикалы будут давать парамагнитную часть восприимчивости, а ее количественное измерение может быть использовано для оценки числа свободных радикалов. Необходимо отметить, что при измерениях восприимчивости возможен ряд ошибок: во-первых, ошибку может вызвать даже небольшая примесь в образце ферромагнитных веществ, обладающих высокой восприимчивостью; во-вторых, возможен собственный диамагнетизм соединений, который может оказаться весьма значительным и который трудно оценить для большинства ароматических систем.

Для обнаружения свободных радикалов используют и ряд других физических методов (метод флеш-фотолиза, масс-спектрометрические исследования, методы абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовой, оптической или инфракрасной областях и др.).

Однако только с открытием метода электронного парамагнитного резонанса в 1944 г. советским ученым Е. К. Завойским начинается плодотворное исследование свободных радикалов в различных отраслях знания. Указанный метод позволил не только прямым способом определить ничтожные концентрации радикалов в системах, но и дал подробные сведения о структуре самих радикалов.

Метод электронного парамагнитного резонанса

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) относится к методам магнитной радиоспектроскопии, т. е. в нем исследуется поглощение электромагнитной энергии радиоволн сверхвысокочастотного диапазона в веществах, помещенных в магнитное поле определенной напряженности. Резонансное поглощение определяется магнитными свойствами вещества, т. е. магнитными свойствами электронов и ядер атомов. Магнитные моменты тесным образом связаны с природой валентной химической связи, так

как химическую связь образуют два электрона, магнитные моменты которых имеют противоположное направление. При разрыве химической связи возникают обычно свободные радикалы, имеющие неспаренный электрон с нескомпенсированным магнитным моментом.

Рассмотрим простой случай, когда свободный радикал имеет неспаренные электроны, не взаимодействующие со своими ядрами. Если на такой образец не накладывать внешнего магнитного поля, то спины и магнитные моменты неспаренных электронов будут ориентированы случайно и иметь равные энергии. При помещении такого образца в постоянное магнитное поле спины[1] и магнитные моменты электронов будут ориентироваться либо по полю, либо против поля. Следовательно, электроны разделяются на две группы, которым соответствуют два энергетических уровня, так называемое зеемановское расщепление (рис. 26). При этом электроны, ориентированные по полю, имеют меньшую энергию, чем при отсутствии поля ($-{}^1/_2\, g\beta H$), и заселяют нижний энергетический уровень. Электроны, ориентированные против поля, имеют бóльшую энергию, чем при отсутствии поля ($+{}^1/_2\, g\beta H$), и заселяют верхний энергетический уровень. В этих выражениях: H — напряженность постоянного магнитного поля; g — так называемый фактор спектроскопического расщепления (величина, характеризующая вклад спин-орбитального момента электрона в его суммарный электронный момент), β — магнетон Бора, равный $\frac{eh}{4\pi m_e c}$, где e и m_e — заряд ($1{,}6\cdot 10^{-19}$ кулон) и масса электрона ($9{,}1\cdot 10^{-28}$ *г*), h — постоянная Планка, c — скорость света (300·000 *км/сек*). Таким образом, при наложении магнитного поля получается следующая картина энергетических уровней (рис. 26, *А*).

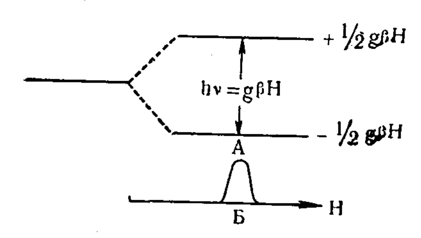


Рис. 26. Условия резонанса для свободного электрона ($\nu = 2{,}8\cdot 10^6$ Н): *А* — расположение энергетических уровней одного неспаренного электрона при отсутствии сверхтонкого взаимодействия; *Б* — кривая поглощения. Объяснение см. в тексте

Расщепление между двумя уровнями увеличивается линейно с увеличением магнитного поля. Для поля напряженностью H оно равно $g\beta H$. Если теперь к образцу приложить радиочастотное поле с частотой ν, то некоторые из электронов, находящиеся на нижнем уровне, будут поглощать энергию этого поля ($h\nu$)

[1] Механический момент, или, как его иначе называют — спин (I),— выражает момент количества движения частиц (например, свободных электронов), $I = \frac{h}{2\pi}$, где h — постоянная Планка, равная $6{,}62\cdot 10^{-27}$ *эрг·сек.*

и переходить на верхний уровень. При условии $h\nu = g\beta H$ будет происходить явление резонанса, которое наблюдается в виде кривой поглощения (рис. 26, *Б*). Поглощение энергии одновременно будет стимулировать процесс перехода на нижний уровень (так называемое вынужденное испускание). Однако для любой системы, находящейся в состоянии термодинамического равновесия с окружающей средой, на нижнем уровне находится бóльшее число электронов, и поэтому будет наблюдаться поглощение энергии. Как было показано, заселенность уровней зависит от температуры и определяется выражением Максвелла — Больцмана [1]:

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}, \qquad (3.7)$$

где ΔE — расщепление двух уровней, k — константа Больцмана $\left(k = \frac{R}{N} = 1{,}38 \cdot 10^{-16}\ \textit{эрг/град}\right)$, T — абсолютная температура ($-273°$),

n_1 — число электронов на верхнем уровне, n_2 — число электронов на нижнем уровне.

Из этого уравнения видно, что разность заселенности уровней больше при низких температурах. Поэтому низкие температуры более благоприятны для наблюдения явления ЭПР. Очевидно также, что если резонансное поглощение радиочастотной энергии происходит непрерывно, то необходимо наличие релаксационных явлений, которые позволяют непрерывно восстанавливать термодинамическое равновесие в системе, т. е. электроны, находящиеся (или перешедшие) на верхнем уровне, должны терять энергию и переходить на нижний уровень. Если такого перехода нет, то явление резонанса не наблюдается. Так как переходы между верхним и нижним уровнем равновероятны, то в момент, равный заселенности ($n_1 = n_2$), поглощения энергии не происходит. Потеря энергии электрона при взаимодействии с тепловыми колебаниями решетки носит название спин-решетчатого взаимодействия и происходит за время τ, называемое временем спин-решетчатой релаксации. Это — время, за которое первоначальный избыток энергии спинов уменьшается на $\frac{1}{e}$. Чем сильнее спин-решетчатое взаимодействие, тем меньше время релаксации и тем уже линия сигнала ЭПР, и наоборот. При больших τ установление равновесия может быть нарушено, если используются слишком мощные источники излучения и будет происходить так называемое явление насыщения. Обычно τ порядка 10^{-8} *сек*. Но для свободных радикалов оно может достигать нескольких секунд. Насыщение может происходить и при относительно небольших мощностях. При

---

[1] В общем виде формула Максвелла — Больцмана представлена на стр. 51. Здесь она дана в приложении к радиоспектроскопии.

этом насыщение уменьшает величину поглощения и искажает форму линии.

Таким образом, установление равновесия с окружающей средой при помощи релаксации приводит к тому, что система отдает энергию до тех пор, пока не будет достигнуто больцмановское распределение. В то же время высокочастотное поле подводит энергию к системе и изменяет больцмановское распределение в направлении равнораспределения.

В явлении ЭПР отдача энергии высокочастотным полем наблюдается в виде кривой поглощения. В принципе, явление ЭПР может иметь место при любой частоте и соответствующей величине постоянного магнитного поля. Но так как величина расщепления пропорциональна H_0, то выгоднее работать при максимально достижимых полях. Если в уравнение резонанса (см. стр. 91) подставить постоянные величины для свободного электрона, то получим следующую зависимость между резонансной частотой электромагнитного поля в мегагерцах и напряженностью магнитного поля в эрстедах: $\nu \simeq 2{,}8\ H_0$. Отсюда видно, что при величине поля в 10 000 *э* резонансная частота равна примерно 30 000 *мггц*, что соответствует длине волны в 1 *см*. Однако для свободных радикалов практически наиболее удобно работать на длине волны 3 *см*.

До сих пор явление ЭПР рассматривалось в отсутствие взаимодействия между магнитным моментом неспаренного электрона и магнитными моментами, имеющихся в молекуле ядер. Наличие такого взаимодействия будет приводить к расщеплению резонансной линии на несколько линий (сверхтонкая структура).

Сверхтонкая структура и величина сверхтонкого расщепления наряду с фактором g являются основными важнейшими характеристиками спектра ЭПР. Значения g-факторов большинства свободных радикалов очень близки к значению g-фактора свободного спина, равного 2,0023.

Для наблюдения спектров ЭПР используют сложный комплекс радиоэлектронной аппаратуры, входящей в состав спектрометра, и электромагнит. В литературе имеется несколько вариантов схем радиоспектрометров. Ниже приводится блок-схема радиоспектрометра ЭПР-2 ИХФ АН СССР (рис. 27). Прибор позволяет определить 10^{-12}—10^{-13} неспаренных электронов в образце.

С помощью метода ЭПР можно проводить анализ системы на наличие неспаренных электронов в исследуемом веществе, количественный анализ концентрации неспаренных электронов путем сравнения сигнала ЭПР от испытуемого вещества с величиной сигнала от стандарта, в котором содержание неспаренных электронов точно известно. Обычно в качестве такого стандарта используются кристаллы или растворы дифенилпикрилгидразила (ДФПГ). Так как каждая молекула этого вещества имеет один неспаренный электрон, локализованный на атоме азота, и сигнал электронного резонанса, полученный от поликристалли-

ческого образца, имеет ширину на полувысоте 2,7 *эрстед*, то интенсивность сигнала от ДФПГ очень велика.

Помимо этого метод ЭПР позволяет на основании анализа ширины и формы сигнала делать важные заключения о взаимодействии электронов с решеткой твердого тела или с частицами жидкости в растворе; по ширине линии ЭПР можно оценить степень обмена, делокализации и подвижности электронов между многими центрами. Анализ сверхтонкой структуры (СТС) спектров ЭПР позволяет в ряде случаев решать вопросы, связанные

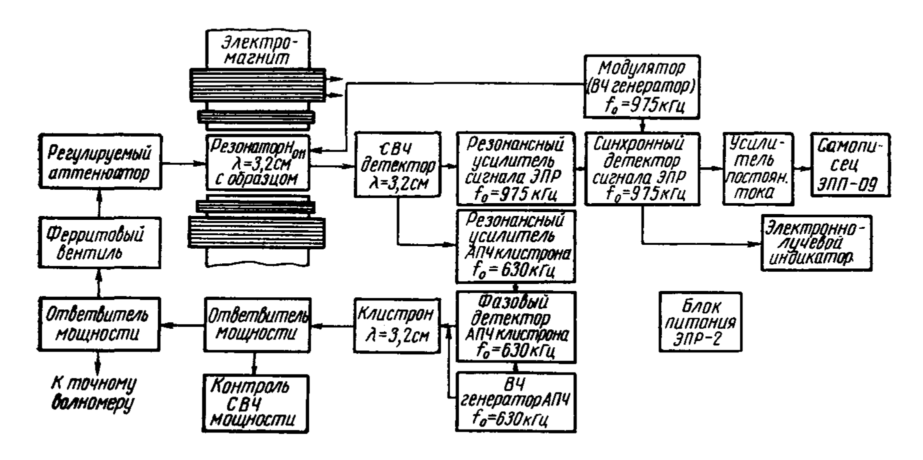


Рис. 27. Блок-схема радиоспектрометра ЭПР-2 ИХФ АН СССР

со строением свободных радикалов. Само положение линии в спектре, т. е. g-фактор, позволяет оценить вклад орбитального момента электронов.

Метод ЭПР нашел широкое применение в физике и химии. Одним из многих непосредственных применений ЭПР к биологическим проблемам явилось измерение свободных радикалов в тканях растительного и животного происхождения. Первое исследование в этом направлении было предпринято американскими исследователями Коммонером, Таунсендом и Пэйком (B. Commoner, I. Townsend a. G. Pake) в 1954 г., а годом позже советскими учеными Л. А. Блюменфельдом и А. Э. Калмансоном. Перед исследователями встала задача прямого определения концентрации свободных радикалов в живых (нормально метаболизирующих) тканях организмов. При этом был выявлен ряд существенных серьезных ограничений применения ЭПР к изучению биологических систем. Одним из таких ограничений является наличие в биологических объектах (за исключением спор и сухих семян) значительного количества воды. Вода, как оказалось, имеет высокую диэлектрическую постоянную и вызывает значительное

поглощение радиоволн сантиметрового диапазона. Водные образцы вызывают большое затухание и значительное уменьшение добротности резонатора радиоспектрометра, а следовательно, и его чувствительности. По этой причине для биологических исследований требуются или спектрометры наивысшей чувствительности, или возникает необходимость работать с лиофильно высушенными препаратами, или с замороженными образцами тканей (диэлектрические потери у льда значительно ниже, чем у воды). Однако всевозможные методы, направленные на исключение влияния воды (лиофилизация тканей, механическая гомогенизация объектов, небиологические дозы веществ в изучении модельных систем субстрат — фермент и т. д.), заведомо искажают действительную картину, так как сами по себе могут изменить концентрацию свободных радикалов и тогда интерпретация получаемых данных неизбежно будет страдать большой произвольностью. Помимо этого методом ЭПР нельзя определить стационарную концентрацию радикалов ниже чувствительности радиоспектрометра, в то время как во многих тканях концентрация радикалов меньше величины 10^{-12} на 1 грамм образца. Наконец, метод ЭПР не дает нам сведений о свободных радикалах с периодом существования порядка 10^{-2}—10^{-5} *сек.*, а позволяет определить сравнительно долгоживущие малоактивные продукты.

В связи с трудностью определения свободных радикалов методом ЭПР в живых системах исследователи попытались разработать иные методы по изучению реакционной способности радикалов в этих системах, не нарушая при этом нормальной жизнедеятельности организмов. В этом отношении существенную пользу оказали работы по изучению свободно радикальных процессов в биологических системах методами измерения реакций привитой сополимеризации и хемилюминесценции.

Метод привитой сополимеризации

Известно, что свободные радикалы часто являются превосходными катализаторами полимеризации ненасыщенных соединений. В ряде случаев путем измерения скорости полимеризации можно определить количество присутствующих свободных радикалов в системе. Полимеризация ненасыщенного соединения основана на том, что радикал захватывает один электрон из электронной пары двойной (или тройной) углерод-углеродной связи, причем образуется новый радикал, в свою очередь отбирающий электрон у следующей молекулы и т. д.

$$\dot{R} + CH_2 \overset{\cdot\cdot}{—} CH_2 \rightarrow R : CH_2 — \dot{C}H_2$$

$$R : CH_2 — \dot{C}H_2 + CH_2 \overset{\cdot\cdot}{—} CH_2 \rightarrow R : CH_2 — CH_2 — CH_2 — \dot{C}H_2 \text{ и т. д.}$$

В конечном итоге процесс полимеризации заканчивается или соединением двух радикалов или замыканием кольца в молекуле или присоединением постороннего соединения.

Свободнорадикальные состояния присущи не только низкомолекулярным веществам, но и высокомолекулярным соединениям. Если полимеризация ненасыщенного соединения индуцирована свободнорадикальными состояниями макромолекул, то образуются так называемые привитые сополимеры (см. схему):

$$1)\ R-H \longrightarrow \dot{R} + \dot{H}$$

$$2)\ \dot{R} + O_2 \longrightarrow R\dot{O}_2 \begin{cases} \xrightarrow{+\dot{H}} ROOH \\ \xrightarrow{+\dot{R}} ROOR \end{cases}$$

$$3)\ \ldots -A-A-\underset{\underset{RO}{|}}{A}-A- \ldots \xrightarrow{+nB} \ldots -A-A-\underset{\underset{\ldots-B-B-O}{|}}{A}-A- \ldots$$

Образование подобных привитых сополимеров было показано на основе разнообразных синтетических и природных полимеров и мономеров (низкомолекулярных веществ, способных к радикальной сополимеризации).

При работе с биологическими объектами обычно используют водорастворимые мономеры винилового ряда (винилпирролидон, акриламид и др.):

$$\begin{array}{c} CH_2{=}CH \\ | \\ N \\ H_2C \diagup \quad \diagdown CO \\ | \qquad\quad | \\ H_2C\text{——}CH_2 \end{array}$$

Винилпирролидон

$$CH_2{=}CH{-}CONH_2$$

Акриламид

Эти соединения берут в нетоксических для организмов концентрациях, но достаточных для осуществления реакции привитой сополимеризации. Определение привитых сополимеров осуществляют несколькими способами.

Первый — микровесовой способ (для биологических объектов, находящихся в состоянии «митотического покоя», например, для семян; дрожжевых клеток, находящихся в непитательной среде, и т. д.).

Второй способ — радиометрический (определение активности препарата).

Третий способ — гистоавторадиография (определение локализации меченного по C^{14} или H^3 мономера в клетках и тканях). Последний способ основан на способности радиоактивного изотопа воздействовать на кристаллы бромистого серебра фото-

эмульсии. Для этого срез опытной зафиксированной ткани накладывают на пластинки с фотоэмульсией, которые проявляют через определенное время при помощи стандартных фотографических методов. Под микроскопом при соответствующем увеличении делают фотоснимки, с помощью которых обнаруживают распределение изотопа в клетках и их компонентах.

Полученные этими методами данные сопоставляют обычно с результатами, достигнутыми методом ЭПР.

Метод хемилюминесценции

Значительную информацию об образовании свободных радикалов, их природе и реакциях в системе дают исследования по хемилюминесценции живых клеток организмов.

Хемилюминесценция, как известно, сопровождает окислительные реакции экзотермического характера, т. е. в основном реакции цепного типа, развивающиеся по радикальному механизму. Показано, что возбуждение свечения (хемилюминесценция) происходит за счет энергии, высвобождающейся при рекомбинации свободных радикалов, а интенсивность свечения пропорциональна скорости рекомбинации, или скорости инициирования в стационарном режиме. Подобный механизм реакции хемилюминесценции подробно изучен для реакции жидкофазного окисления углеводородов и их производных (Р. Ф. Васильев, Н. М. Эмануэль). Установлено, что указанное окисление углеводородов (а также липидов «in vitro») представляет собой цепную радикальную реакцию. Радикалами, ведущими цепь, являются углеводородный радикал $\dot{R}$ и перекисный радикал $RO_2^{\bullet}$. Механизм реакции состоит из следующих элементарных процессов:

инициирование цепей
$$\begin{cases} \dot{R} + O_2 \longrightarrow \dot{R}O_2 \\ \dot{R}O_2 + PH \longrightarrow ROOH + P \end{cases}$$

обрыв цепей
$$\begin{cases} \dot{R} + \dot{R} \longrightarrow \text{углеводород } R - R(+\text{свет}) \\ \dot{R} + \dot{R}O_2 \longrightarrow \text{перекись } ROOR(+\text{свет}) \\ \dot{R}O_2 + \dot{R}O_2 \longrightarrow \text{спирт} + \text{карбонильное соединение} + O_2(+\text{свет}) \end{cases}$$

Показано, что максимальное свечение наблюдается при рекомбинации радикалов типа $\dot{R}O_2$.

Свечение однако, может происходить не только при рекомбинации радикалов. Введение в хемилюминесцирующий раствор веществ, способных быть акцепторами энергии и люминесцировать (активаторов А), приводит дополнительно к процессам дезактивации возбужденных молекул кислородом или другими тушителями

в повышенных концентрациях ($P^* + O_2 \rightarrow P + O_2$) еще к одному процессу — передаче энергии при столкновении Р с А, после чего следует излучение ($P^* + A \rightarrow P + A^*$; $A^* \rightarrow A + h\nu_A$).

Развитие указанных представлений для биологических систем позволило определить роль биолипидов в реакциях тканей организма на внешние воздействия (действие видимого, ультрафиолетового и ионизирующего излучений; канцерогенез и др.).

Обычно регистрацию свечения осуществляют при помощи специального приемника излучения — фотоэлектронного умножителя

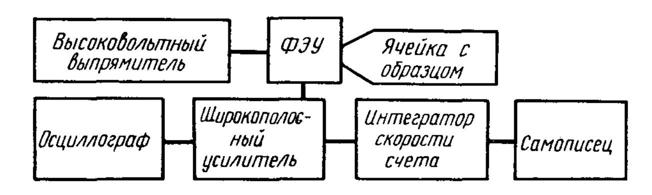


Рис. 28. Блок-схема установки для измерения реакции хемилюминесценции

(ФЭУ) с фотометрической установкой, работающей в режиме счетчика импульсов (фотонов). Блок-схема такой установки приведена на рис. 28. Для изучения свечения биосистем и их компонентов используют, как правило, ФЭУ с достаточно низким темновым током и высокой интегральной чувствительностью, позволяющей регистрировать сверхслабые световые потоки без предварительного охлаждения. Примером такого приемника излучения могут служить ФЭУ-42 и ФЭУ-64 с максимумом чувствительности в сине-зеленой области спектра.

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ — АКТИВНЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В БИОСИСТЕМАХ

Предположения о том, что ряд основных биохимических реакций протекают с участием свободных радикалов в качестве активных промежуточных продуктов, высказывались уже давно. В 30-х годах было показано, что в процессе окисления пищевых веществ в клетках должны образовываться свободные радикалы как за счет самих окисляющихся веществ, так и за счет некоторых активных низкомолекулярных соединений (типа красителей), играющих важную роль в биокатализе. Особенно большое значение, по-видимому, имеет возникновение радикальных реакций при повреждающих воздействиях.

Известно, что биоокисление является основным источником энергии для самых различных биологических процессов. В этих процессах огромное значение имеют сопряженные реакции пере-

носа электронов при участии разнообразных ферментативных систем. Михаэлисом была выдвинута гипотеза о ступенчатом окислении, согласно которой дегидрирование ряда веществ протекает по механизму: $AH_2 \rightarrow \dot{A}H + \dot{H} \rightarrow A + 2\dot{H}$. Сравнительно устойчивые радикалы типа АН, появляющиеся в качестве промежуточных продуктов в ходе ступенчатого окисления, Михаэлис назвал семихинонами. Возникновение свободных радикалов семихинонной природы при дегидрировании ряда красителей им было доказано методом измерения магнитной восприимчивости. Однако метод магнитных весов, использованный Михаэлисом, имеет низкую чувствительность, вследствие чего ему не удалось прямо показать наличие свободных радикалов в модельных ферментативных системах и тканях организма.

Открытие и разработка метода ЭПР позволили непосредственно определить свободные радикалы в ходе ферментативного окисления. В первых же работах было установлено, что все активно метаболизирующие ткани растительного и животного происхождения содержат свободные радикалы в концентрации 10^{-6}—10^{-8} М на 1 грамм сухого веса ткани. Сам сигнал ЭПР представлял собой узкую одиночную линию с g-фактором, близким к g-фактору свободного электрона, и полушириной 5—10 *эрстед*. При изучении ферментативного окисления было показано, что наличие сигнала ЭПР связано с ферментативной активностью. Время появления сигнала было пропорционально времени, за которое окислялось данное количество субстрата. Ни субстрат, ни фермент, ни даже субстрат и фермент вместе при отсутствии кислорода не дают сигнала ЭПР. Последний возникает только при наличии трех компонентов системы: фермента, субстрата и кислорода. Интенсивность сигнала ЭПР (его амплитуда), как и скорость ферментативной реакции, пропорциональна концентрации фермента и зависит от концентрации субстрата и кислорода. Эти выводы были сделаны при изучении процессов биоокисления, протекающих с участием дегидрогеназ, цитохрома С, оксидаз и других окислительно-восстановительных ферментов.

В настоящее время изучение ферментативных реакций окисления позволило обнаружить несколько типов свободных радикалов, возникающих в ходе окислительно-восстановительных реакций. Во-первых, свободные радикалы, возникающие при присоединении молекулы субстрата к металлофлавопротеину. Во-вторых, радикалы донора водорода. Подобного рода радикалы обнаруживают при действии пероксидазы на перекись водорода в присутствии разных доноров водорода. Зависимость вида спектра ЭПР от структуры донора позволила идентифицировать наблюдавшиеся радикалы пирогаллола, дигидрофумаровой кислоты, аскорбиновой кислоты. В-третьих, группа свободных радикалов, возникающих за счет взаимодействия фермента с молекулами воды и кислорода и реагирующих с субстратом.

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ В РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Исследование свободных радикалов, возникающих в биосистемах под действием ионизирующего излучения, методами ЭПР, привитой сополимеризации и хемилюминесценции предоставило новые возможности для изучения первичных радиационно-химических процессов в биологии. Возможность прямого экспериментального обнаружения свободных радикалов, возникающих при облучении, изучение кинетики накопления и гибели радикалов, определение энергий рекомбинации радикалов в системе, корреляция спектров радикалов в облученных веществах, с наблюдаемыми биологическими повреждениями, исследование влияния на радиобиологические эффекты величины и мощности дозы, типа излучения, роли воды, разных газов (в том числе и кислорода), противолучевых препаратов — это вопросы, которые можно решать с помощью применения вышеуказанных методов исследования.

Начиная с 1956 г., было проведено изучение спектров ЭПР облученных биологически важных структур возрастающей степени сложности и различной степени нативности, начиная от простых мономерных звеньев (аминокислоты) и кончая субмикроскопическими (клеточными) или тканевыми образованиями. Анализируя результаты этих работ, можно утверждать, что все облученные аминокислоты, нуклеиновые основания, полипептиды, нуклеотиды и другие дают после облучения интенсивные спектры ЭПР с шириной в десятки и сотни эрстед, причем во многих случаях с ярко выраженной сверхтонкой структурой за счет взаимодействия неспаренных электронов с протонами и атомами азота, входящими в состав возникающих в результате облучения свободных радикалов. При дозе облучения в 10^7 рентген выход свободных радикалов составляет около 10^{18} — 10^{19} парамагнитных частиц на 1 грамм сухого образца. Это позволяет говорить, что при облучении мономерных звеньев биополимеров на каждый акт ионизации может возникнуть, приблизительно, один радикал. Более того, по спектрам ЭПР можно сравнительно точно во многих случаях определить строение свободных радикалов облученных низкомолекулярных веществ. В противоположность низкомолекулярным веществам, спектры ЭПР облученных нативных белков, нуклеиновых кислот и лиофилизированных тканей характеризуются рядом важных особенностей: число свободных радикалов, возникающих при одинаковой дозе облучения в биополимерах и нативных тканях, на несколько порядков меньше, чем в мономерных продуктах; сигнал от образцов не представляет собой наложения спектров ЭПР отдельных облученных аминокислот (или нуклеотидов), а является при наблюдении на воздухе одиночным узким сигналом с полушириной порядка 5—15 эрстед и с отсутствием сверхтонкой струкутуры. В некоторых серусодержащих белках имеется налицо сигнал с g-фактором, характер-

ным для неспаренных электронов, локализованных на атоме серы.

Отличие биополимеров и тканей от низкомолекулярных веществ как по форме и ширине спектров ЭПР, так и по радиационному выходу парамагнитных частиц на 1 грамм говорит о возможности делокализации (миграции) неспаренных электронов по нативной биополимерной молекуле, обладающей упорядоченной сеткой сопряженных водородных связей, и о возможности «залечивания» части радиационных повреждений в этих структурах.

Первые количественные исследования спектров ЭПР облученного живого материала были проведены Циммером (K. Zimmer) на зародышах, выделенных из покоящихся семян. При этом не было обнаружено линейной зависимости выхода свободных радикалов от дозы облучения. В дальнейшем исследовали зависимость изменения концентрации свободных радикалов, образованных в семенах и спорах различных растений, от окружающего газа (кислород, воздух, азот и др.). При этом проводили химическое разделение материала на белки, углеводы, жиры и масла. Для некоторых злаковых растений было найдено, что концентрации радикалов в этих фракциях для равных доз облучения относятся соответственно как 3 : 1 : 3 : 0. Установлена корреляция между уменьшением радиобиологического эффекта и способностью свободных радикалов, появляющихся при гамма-облучении семян пшеницы, вызывать реакцию полимеризации ряда ненасыщенных соединений (винилпирролидон, акриламид и др.). Оказалось, что свободные радикалы природных компонентов облученных клеток имеют неодинаковую природу, зависящую от температуры и кислорода как в момент самого облучения, так и в пострадиационный период. В присутствии кислорода воздуха появляющиеся при облучении свободные радикалы вызывают полимеризацию введенных в объекты веществ, которая возрастает с повышением температуры, что связано с распадом перекисных соединений, образующихся в результате первичных радиационно-химических реакций. В отсутствии кислорода наблюдается обратная картина процесса. При повышенных температурах подвижность радикалов увеличивается, что и приводит к взаимному уничтожению активных центров, инициирующих процесс полимеризации.

Нарушение характера свободнорадикальных процессов проявляется неодинаково при разных формах лучевого поражения животных. При полулетальных дозах облучения животных в пострадиационный период наблюдается регуляция свободнорадикальных реакций в некоторых тканях с возвращением концентрации свободных радикалов к норме. При заведомо летальных дозах такой регуляции не происходит. Регуляция указанных процессов объясняется тем, что пораженные в первый момент природные системы, управляющие уровнем свободнорадикальных

реакций, в последующие сроки способны к частичному или полному, в зависимости от дозы облучения, восстановлению.

Результаты многочисленных исследований свободных радикалов в радиобиологических процессах позволили установить ряд основных положений. Во-первых, ионизирующие излучения образуют в живом материале свободные радикалы. Во-вторых, концентрация свободных радикалов, индуцируемых радиацией, увеличивается с возрастанием дозы облучения. В-третьих, измеримые концентрации свободных радикалов зависят от окружающего газа и содержания воды в системе. В-четвертых, концентрация свободных радикалов после облучения в ряде случаев уменьшается относительно медленно и достаточно хорошо измерима в течение длительного времени в зависимости от объекта и окружающих условий. Наконец, в ряде случаев доказано, что существует молекулярное взаимодействие между противолучевыми веществами и защищаемым материалом.

УЧАСТИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ПРОЦЕССАХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА

В последние годы проявляется значительный интерес к изучению роли и поведения свободных радикалов в живых организмах при различных патологических процессах, в частности при злокачественном опухолевом росте (Н. М. Эмануэль).

Наличие природных ингибиторов в тканях регулирует уровень свободнорадикальных процессов. Это позволяет сделать предположение о существовании вполне определенного соотношения между содержанием таких ингибиторов и концентрацией свободных радикалов для интактных организмов и организмов-опухоленосителей. В этом отношении большого интереса заслуживают работы Б. Н. Тарусова, показавшие высокую антиокислительную активность опухолей животных по сравнению с другими тканями. Установлено, что в ходе развития опухоли у животных (карцинома Уокера, саркома 45) содержание биоантиоксидантов во всем объеме опухоли резко возрастает. При этом рост злокачественной опухоли сопровождается обеднением биоантиоксидантами печени животного-опухоленосителя. Полагают, что перенос этих соединений в организме животного осуществляется с током крови. С этими данными интересно сопоставить исследования динамического изменения содержания свободных радикалов в органах животных в ходе развития опухолевых процессов. Было установлено, что уровень свободнорадикальных реакций в тканях животных с привитой опухолью или с лейкозом имеет резко выраженный максимум (минимум для печени в случае животных с привитой опухолью) ко времени максимального развития опухолевых процессов, т. е. было показано, что концентрация свободных радикалов как

в тканях животного-опухоленосителя, так и в самой опухоли не остается неизменной, а существенно меняется. При развитии лейкозного процесса в тканях животных (селезенка, печень и др.) вначале наблюдается увеличение концентрации свободных радикалов, достигающее максимального уровня на четвертые сутки. Интересно отметить, что изменение содержания свободных радикалов обнаруживается до появления других признаков развития лейкозного процесса: увеличения веса селезенки, увеличения числа лейкоцитов и гемоцитобластов в периферической крови и костном мозгу. Максимум изменения содержания свободных радикалов совпадает с началом регистрируемых изменений в селезенке (увеличение веса), характерных для развития лейкозного процесса. В фазе интенсивного развития лейкоза наблюдается уменьшение концентрации свободных радикалов в селезенке, которое к моменту гибели животных падает ниже нормы.

Подобные закономерности были установлены для животных с разными штаммами опухолей. Наблюдаемое различие выражалось лишь в сроках образования той или иной опухоли у животных и связанного с этим изменения содержания свободных радикалов в соответствующих тканях: чем ранее изменялась (обычно, увеличивалась) концентрация свободных радикалов в ткани, тем быстрее развивался процесс опухолеобразования у животных.

В последнее время было выдвинуто предположение, что радикалы, измеряемые в тканях животного-опухоленосителя с помощью метода ЭПР, являются неактивными, в какой-то степени стабильными радикалами, образующимися из ингибиторов (биоантиоксидантов). Для доказательства такого положения были изучены спектры ЭПР, антиокислительная активность и хемилюминесценция липидов печени животного-опухоленосителя. Оказалось, что имеется корреляция между увеличением биоантиоксидантов и возрастанием сигнала ЭПР липидов печени, причем максимумы приходятся на одни и те же сроки. Это подтверждается и другими данными, где с помощью метода привитой сополимеризации показано уменьшение активных радикалов липидов печени на те же сроки.

Таким образом, из этих, еще немногочисленных данных видно, что развитие указанных представлений могло бы оказать существенную помощь как для выяснения природы злокачественного роста, так и для установления механизма действия лекарственных препаратов и разработки рациональных принципов химиотерапии рака.

ГЛАВА IV

ПОЛИМЕРНАЯ ПРИРОДА ПРОТОПЛАЗМЫ

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОТОПЛАЗМЕ

Обычно под протоплазмой понимают комплекс разнообразных веществ, составляющих содержимое животных и растительных клеток, физическую природу которого отождествляют с коллоидной системой.

Обобщающее понятие о протоплазме вытекает из того, что содержимое любых живых клеток, несмотря на их разнообразие, сходно по своему основному составу и свойствам точно так же, как сходны важнейшие проявления их биологических функций.

Термин «протоплазма» впервые был предложен чешским биологом Пуркинье (J. E. Purkinje, 1839), для обозначения формообразовательного вещества — зародыша животных. Позднее, в 1846 г., немецкий ботаник Моль (G. Mole) назвал протоплазмой вязкое жизнеспособное содержимое клеток растений. В дальнейшем этот термин был распространен на все клетки животных, растений и простейших организмов.

Начиная с конца XIX в. было предложено множество теорий строения протоплазмы. В 1875 г. Фроман (A. Froman) предположил, что протоплазма представляет собой фибриллярную сеть. Эта концепция послужила основой ретикулярной теории, разработанной в дальнейшем последователями Фромана. В 1882 г. Флеминг (A. Flemming) также на основании изучения фиксированного и окрашенного материала вновь подчеркнул, что протоплазма должна иметь фибриллярную природу. Хотя обе эти концепции занимают известное место в современных представлениях о протоплазме, они не могут считаться приемлемыми в своем первоначальном виде. Альтман (R. Altman), исходя из грубой зернистости таких клеток, как амеба и яйца некоторых морских животных, предложил гранулярную теорию протоплазмы. Однако и это представление оказалось далеко не полным. В следующем году Бючли выступил с альвеолярной теорией протоплазмы, или теорией пены, основанной главным образом на изучении строения таких клеток, как яйца некоторых морских радиолярий, в которых взвешено множество жировых капель. В 1925 г. Вильсон (E. Wilson) предложил коллоидную теорию протоплазмы, принятую в настоящее время многими исследователями. Эта теория физико-

химического строения протоплазмы позволила в те годы объяснить наблюдаемый внешний вид протоплазмы (ее структуру), колебания вязкости протоплазмы — от текучести, приближающейся к текучести воды, до вязкости геля, приближающейся к вязкости упругого твердого тела, как одновременное и независимое протекание в пределах одной живой клетки (протоплазмы) множества разнообразных биохимических реакций.

Работами многих исследователей было установлено, что протоплазма является сложнейшей системой, состоящей из разнообразных белков, нуклеиновых кислот, жиров, углеводов, воды и некоторых низкомолекулярных органических соединений и минеральных солей.

Так как главную роль в жизнедеятельности организмов играют сложные белки, состоящие из сочетания простых белков (протеинов) с нуклеиновыми кислотами и липидами (жирами), а также минеральных солей, то можно сформулировать первый (химический) признак протоплазмы. Это, следовательно, *специфический липонуклеопротеидный комплекс, функционирующий в теснейшей связи с водно-солевой средой*. Однако указанный химический признак не исчерпывает общее понятие о протоплазме. Он определяет лишь химический состав главнейших компонентов, составляющих содержимое живой клетки.

Одной из удивительных характеристик протоплазмы является сложнейшая упаковка полимерных молекул (белков, нуклеиновых кислот и их комплексов друг с другом и с липидами) в надмолекулярные структурные образования. Наряду с высокоасимметрическими фибриллярными и разветвленными пространственными структурами в самой клетке функционируют также сплошные двухмерные пленки, составляющие мембранные оболочки вокруг клетки, ее ядра и ядрышек, а также мембранные перегородки внутри самой клетки.

Следовательно, дело не только в специфическом химическом составе протоплазмы, а также в организации полимерных молекул в этой протоплазме в виде сложнейших сооружений, регулирующих, направляющих и распределяющих молекулы органических и неорганических низкомолекулярных веществ в процессе жизнедеятельности организма.

Таким образом, вторым (структурным, или физическим) признаком протоплазмы является *специфический характер полимерных надмолекулярных образований, приводящий к образованию сложнейших конструкций как самой клетки, так и самостоятельных ее элементов (органоидов)*.

При этом нельзя забывать о том, что «строительным» материалом для структур протоплазмы являются белковые молекулы, сочетающиеся в ряде случаев с другими, небелковыми, веществами, т. е. молекулы сложных полимерных соединений. Поэтому для понимания процессов структурообразования и характеристики

надмолекулярных структур в протоплазме необходимо ясно представлять себе природу полимерного состояния, условия сочетания полимерных молекул в надмолекулярные образования, характер поведения и свойства полимерных молекул.

Так как основным конструкционным элементом для построения структур в протоплазме являются гидрированные белковые комплексы, т. е. сложные высокомолекулярные студни (гели), а последние до сих пор еще неправильно рассматривают как лиофильные коллоиды, то и физическую природу протоплазмы обычно отождествляют с коллоидной системой.

Под коллоидами понимают двух- или многокомпонентные системы, в которых один компонент является средой (дисперсионная среда), а другой или другие высокодисперсными образованиями (дисперсная фаза), отделенные от дисперсионной среды поверхностями раздела. Следовательно, такие системы являются многофазными, гетерогенными; они термически неустойчивы и для их устойчивости необходимо введение дополнительного компонента, который способен диссоциироваться в дисперсионной среде. Эта диссоциация позволяет одноименно заряженным ионам адсорбироваться на поверхности дисперсной фазы, а другим — противоположно заряженным ионам располагаться в дисперсионной среде, вокруг каждой частицы. Сольватация таких противоионов и их связь с ионами, адсорбированными на поверхности дисперсной фазы, и приводит к той или иной степени устойчивости всей коллоидной системы в целом.

Однако изложенные классические представления о коллоидных системах вообще не соответствовали поведению большой группы веществ, составляющих, главным образом, природные соединения или их производные (целлюлоза, крахмал, белки и их производные и т. д.). Такие вещества самопроизвольно диспергировались, а для их устойчивости не было необходимости во введении в систему специальных стабилизаторов. Кроме того, такие вещества, будучи диспергированы по ряду своих свойств, резко отличались от обычных коллоидных систем. Так, например, их диспергирование осуществляется с предварительным набуханием и дисперсные системы из таких веществ резко повышают вязкость, осмотическое давление и другие характеристики с увеличением концентрации, а при повышенных концентрациях они проявляют в той или иной степени механические свойства твердого тела. Благодаря их самопроизвольному диспергированию и особенностям поведения в диспергированном состоянии такие вещества были выделены в самостоятельный класс коллоидных систем — лиофильные коллоиды. Указанные особенности лиофильных коллоидов были объяснены особой ролью сольватации частиц коллоида молекулами дисперсионной среды, а для гидрофильных коллоидов, следовательно, особой ролью воды. Отсюда возникли представления об особом значении связанной воды, резко отличающемся от

поведения воды в гидратных оболочках обычных низкомолекулярных веществ.

В 1937 г. впервые В. А. Каргину с сотрудниками удалось показать, что указанные представления не соответствуют действительности и что под лиофильными коллоидными системами следует понимать истинные растворы и студни полимерных соединений с их гомогенностью, термодинамической устойчивостью и, следовательно, однофазностью. Характерные же признаки таких систем целиком определяются свойствами полимерных молекул и их способностью образовывать надмолекулярные структуры (рои), устойчивость которых значительно выше по сравнению с роями в низкомолекулярных жидкостях из-за резко замедленных релаксационных процессов в больших молекулах полимеров.

В свете этих представлений физическое понятие о протоплазме как о коллоидной системе не отражает всего многообразия физических состояний ее основных высокомолекулярных компонентов.

Поэтому полимерно-структурное понятие о протоплазме в наибольшей степени приближения характеризует ее физическое существо.

Однако и этот второй структурный признак в дополнение к химическому не определяет общего понятия о протоплазме.

В самом деле, знание химического состава содержимого живой клетки и полимерно-структурной характеристики протоплазмы еще не дает общего представления о ней как об основной системе, проявляющей, жизненные функции организма.

Биологическим признаком протоплазмы является *такая направленность химических процессов в этой системе, при которой осуществляется непрерывно протекающие два противоположных процесса: процесс распада веществ и процесс их синтеза, т. е. то, что определяет обмен веществ организма (метаболизм).*

Таким образом, *под протоплазмой следует понимать содержимое живой клетки, состоящее из сложнейшего полимерного липонуклеопротеидного комплекса, образующего разнообразные надмолекулярно-структурные элементы и функционирующего в теснейшей связи с солевыми растворами в направлении непрерывного самообновления.*

В этом определении, как это легко видеть, включены все три признака протоплазмы: химический, физический и биологический.

ПОНЯТИЕ О ПОЛИМЕРАХ

Под высокомолекулярными соединениями, или полимерами, понимают вещества, состоящие из больших и гибких молекул с характерным для них цепным строением.

Это определение отражает специфическую характеристику полимерных молекул, дает представление о размерах таких молекул, их строении и основном свойстве — гибкости.

Повторение звеньев, в одном случае, приводит к линейному построению цепных молекул полимера, а в другом — к возникновению разветвленных цепей и, наконец, в третьем — к сочетанию звеньев в общую, химически связанную пространственную сетку.

Примерами большого числа полимеров с линейным строением молекулярных цепей могут служить большинство белков, нуклеиновые кислоты, каучук, гуттаперча, целлюлоза.

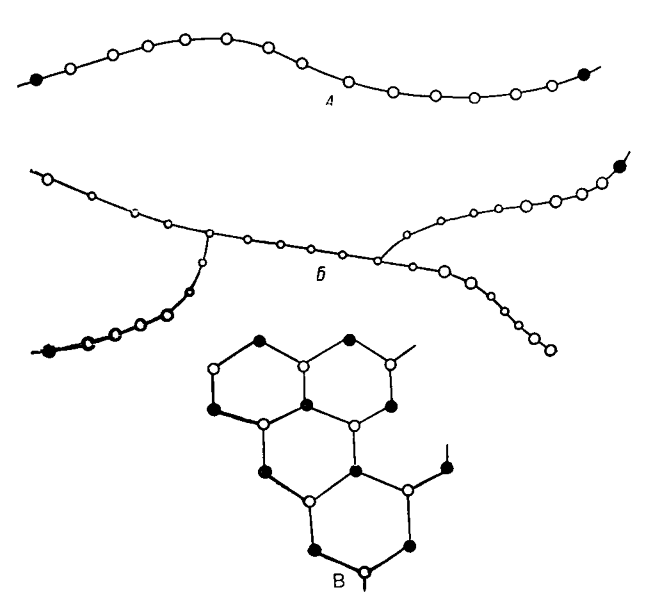


Рис. 29. Схемы строения полимерных молекул: *А* — линейного полимера; *Б* — разветвленного; *В* — сетчатого

Примерами полимеров с разветвленным строением молекулярных цепей могут служить молекулы гликогена и амилопектина.

Наконец в качестве примера биополимеров, строение молекул которых характеризуется пространственной сеткой, могут служить молекулы некоторых белков, в частности, инсулина.

Перечисленные выше типы полимерных молекул можно изобразить схематически (рис. 29).

Если повторяющиеся в молекуле полимера звенья соответствуют одному и тому же химическому составу, то такие соединения обычно называют гомополимерами. Так, молекулы целлюлозы и гликогена являются гомополимерами. Если же в моле-

куле полимера содержатся разные по своему химическому составу звенья, то такие соединения называют сополимерами.

Сополимеры отличаются по характеру чередования звеньев различного химического состава. Если различные по химическому составу звенья чередуются по случайному принципу в линейной молекуле полимера, то такие соединения называются хаотическими (или обычными) сополимерами. Если же это чередование осуществляется со строгим порядком последовательности звеньев, то такие соединения носят название регулярных сополимеров. К ним относятся все белковые вещества.

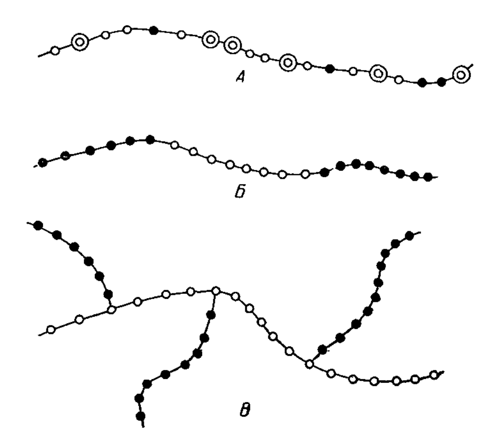


Рис. 30. Схемы строения молекул различных типов сополимеров: *А* — хаотического трехзвенного; *Б* — блок-сополимера; *В* — привитого сополимера

Возможно получение сополимеров, в которых сочетание элементов молекулы происходит не по отдельным звеньям различного химического состава, а по целым группам одинаковых химических звеньев. Если такие группы, состоящие из большого числа одинаковых химических звеньев, чередуются с блоками из большого числа других одинаковых звеньев, составляющих вместе общую линейную молекулу, то такие соединения называются блок-сополимерами. Если в молекулярной цепи гомополимера химически присоединены боковые цепи из звеньев другого химического состава, то такие разветвленные соединения носят название привитых или графт-сополимеров.

Указанная характеристика разных типов сополимеров иллюстрируется схемами, приведенными на рис. 30.

Элементы молекул полимеров, т. е. химические звенья, полностью отвечающие химическому составу низкомолекулярных веществ, из которых в результате химических реакций образуется полимер, носят название мономеров. Если химический состав звена полностью соответствует молекуле исходного мономера, то такие полимеры образуются в результате реакции полимеризации (присоединения мономеров за счет раскрытия двойных или тройных связей или разрыва неустойчивого цикла). Если химический состав мономеров отличается от такового в звене полимерной цепи, то такие полимеры могут быть получены в результате реакции поликонденсации с выделением побочных

продуктов, например, воды. Особенностью химического состава полимерных цепей является присутствие на их концах химических концевых групп, которых нет во всех остальных звеньях молекулярной цепи полимера. Подобные группы необходимы для насыщения валентностей на концах цепи и могут быть либо одного и того же, либо разного химического состава для обоих концов цепи.

Количество химических звеньев в молекулярной цепи полимера, определяющее ее длину, называется степенью полимеризации. Величина молекулярного веса полимера прямо пропорциональна степени полимеризации его цепных молекул, так как она является произведением молекулярного веса звена на их число в молекуле (т. е. на степень полимеризации). К этому произведению следует добавить еще молекулярный вес концевых групп полимерной цепи.

Высокомолекулярные соединения обладают тремя основными характеристиками молекул, специфическими только для полимеров и резко отличающими их от молекул обычных низкомолекулярных соединений. Они обладают высокими значениями степени полимеризации (и поэтому их называют высокополимерами), а отсюда и высокими значениями молекулярных весов, т. е. являются высокомолекулярными соединениями. Характерной особенностью полимеров является также специфическое цепное строение молекул, приводящее к исключительно высокой степени их асимметрии. Одной из важнейших характеристик молекул полимеров является их гибкость.

Представления о гибкости цепных молекул полимеров, выдвинутые Куном в 1934 г. (W. Kuhn), основаны на способности любых молекул осуществлять внутреннее тепловое движение.

Известно, что молекулы способны осуществлять три вида теплового движения: поступательное, вращательное и колебательное. Указанные виды движения относятся к целой молекуле; они хорошо изучены различными физическими, главным образом, спектроскопическими методами. Однако при спектральном исследовании теплового движения молекул ряда веществ были обнаружены новые линии поглощения, которые свидетельствовали о наличии еще одного вида движения, а именно движения одной части молекулы относительно другой. Этот тип теплового движения был назван внутренним движением молекул.

Любые повороты одних атомов или атомных групп в молекуле по отношению к другим связаны с определенными условиями, ограничивающими эти повороты. К этим условиям относятся: неизменность валентных связей, которые являются жесткими и не могут растягиваться или сжиматься; ограниченность гибкости валентных углов, которые могут изменяться от своего обычного положения не более, чем на 20°; ограниченность сжатия

внешних сфер валентно не связанных атомов, которые при тесноте в молекуле способны сжиматься не более чем на 30% их размеров.

Возможны случаи, когда неосуществимы какие-либо внутренние движения одних атомных групп по отношению к другим (например, наличие ненасыщенной связи между атомными группами). В этом случае величина энергии для осуществления какого-либо поворота атомов друг относительно друга, соединенных ненасыщенными связями, соизмерима с химической энергией и, следовательно, такого рода изменения взаимного расположения атомов в пространстве следует относить к химическим превращениям. В принципе, такие изменения возможны. Возникающие в результате таких изменений стереоизомеры носят название конфигурационных стереоизомеров. Это не имеет никакого отношения к внутреннему тепловому движению молекул. Стереохимия, изучающая изомеры, которые возникают в результате теплового движения, получила название динамической стереохимии, а изучаемые ею изомеры конформациями молекул. В ряде случаев время существования каждого из изомеров в одной и той же молекуле низкомолекулярного вещества имеет порядок 10^{-7}—10^{-10} *сек.*

В настоящее время наблюдается развитие важного этапа в стереохимии — разделения ее на две самостоятельные области знания — *статическая, или конфигурационная, стереохимия и динамическая, или конформационная, стереохимия.* Первая изучает устойчивые стереоизомеры, или конфигурации, молекул, которые могут быть индивидуализированы и превращение которых из одной конфигурации в другую связано с разрушением химических связей в одном месте молекулы и возникновением такой связи в другом месте молекулы. Вторая, недавно зародившаяся и интенсивно разрабатываемая в последнее время, изучает энергетические соотношения, отвечающие различным конформациям молекул. Их возникновение обязано внутреннему тепловому движению молекул. Такие изомеры не могут быть индивидуализированы, а сами переходы от одной конформации к другой не связаны с химическими превращениями в молекулах.

Усложнение химического состава и строения молекул, в особенности при переходе к высокомолекулярным соединениям, очень затрудняет изучение конформаций молекул, хотя теоретические расчеты позволяют определить их количество, используя методы и приемы статистической физики. Так, для олигомера с шестью атомами углерода в цепи возможно существование 16 конформационных изомеров, а для полимерной цепи с C_{1000} возможно существование 10^{300} конформационных изомеров. В действительности, число конформаций, возникающих в больших полимерных молекулах в результате внутреннего теплового движения, неизмеримо меньше. Можно утверждать, что число практически возможных конформаций, осуществляемых в молекуле, зависит от

степени внутри- и межмолекулярного взаимодействия. Последние определяют величины потенциала барьерных вращений, ограничивая тем самым число практически возникающих при тепловом движении конформационных изомеров молекулы.

При этом под внутримолекулярным взаимодействием понимают взаимодействие между атомными группами, не связанными непосредственно силами химического сродства. Под межмолекулярным взаимодействием понимают взаимодействие между атомами, принадлежащими соседним молекулам.

Межмолекулярные или вандерваальсовские силы, как известно, могут быть оценены энергией взаимодействия, которая определяется следующими уравнениями:

для случая взаимодействия диполей определяют ориентационное взаимодействие:

$$V_{\text{ор}} = -\frac{2}{3} \cdot \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6 kT}; \tag{4.1}$$

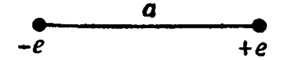
для случая взаимодействия диполя с недиполем определяют индукционное взаимодействие:

$$V_{\text{инд}} = -2\frac{\mu^2 \alpha}{r^6}; \tag{4.2}$$

для случая взаимодействия недиполей определяют дисперсионное взаимодействие:

$$V_{\text{дис}} = -\frac{3}{2} \cdot \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \cdot \frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6}, \tag{4.3}$$

где r — расстояние между концами молекул; размеры согнутой молекулы (Å);
k — константа;
T — абсолютная температура;
I — потенциал ионизации молекулы;
V — энергия взаимодействия;
α — поляризуемость молекулы;
μ — дипольный момент, где $\mu = e \cdot a$ (e — заряд, a — расстояние между зарядами,



($\mu \cong 10^{-18}$ СГСЕ *см*, или $Г^{1/2} \cdot см^{5/2} \cdot сек^{-1}$).

Обычно величины энергий межмолекулярного взаимодействия невелики и определяются значениями от нескольких десятых *ккал/моль* до нескольких *ккал/моль*. Однако существуют межмолекулярные силы с существенно большими энергиями, возникающими при взаимодействии атомов водорода в определенных атомных группах с некоторыми другими атомами. Эти силы были вызваны водородными связями. До настоящего времени установлено, что такого рода связи осуществляются водородом

лишь в группах:

O—H; N—H; F—H; Cl—H,

принадлежащих одной молекуле или одной части молекулы с атомами O, N, F, Cl и S, принадлежащих другой молекуле или другой части молекулы. Соответственно этому различают внутри- и межмолекулярные водородные связи. Наиболее полно такие связи изучены для водорода в группах OH, COOH, NHCO и других.

Важные особенности поведения многих природных полимеров, таких, например, как целлюлоза и белки, обязаны возникновением в них внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей. Сравнительно высокие энергии водородных связей еще более сокращают число конформационных изомеров, возникающих в результате внутреннего теплового движения молекул, в которых осуществляются водородные связи. Более того, возникающие конформационные изомеры, в которых атомы или атомные группы скреплены водородными связями, становятся более устойчивыми, в силу чего вся молекула в целом делается более жесткой. Поэтому водородные связи иногда рассматриваются не только как самые сильные межмолекулярные связи, но и как самые слабые химические связи. Можно понять, что сам факт гибкости полимерной молекулы предопределяет вероятность возникновения разных форм такой молекулы, начиная от предельно вытянутой цепи (палочкообразной формы) и кончая предельносогнутой цепью (глобулярной формы).

Подробное исследование внутреннего теплового движения в молекулах низкомолекулярных веществ выявило большое значение взаимодействия валентнонесвязанных атомов в характере такого движения. Эти исследования позволили внести существенные исправления в представление о характере формы цепных молекул полимеров, определяемой их средними размерами с учетом потенциальных барьеров вращения звеньев друг относительно друга по одинарным связям, входящим в цепи. В общем виде формула, характеризующая размеры цепи с учетом указанного условия, принимает следующий вид:

$$\bar{r}^2 = l^2 \frac{2nV_0\,(1+\cos\beta)}{kT\,(1-\cos\beta)}\,, \tag{4.4}$$

где V_0 — величина энергии при переходе от устойчивой к неустойчивой конформации молекулы; l — линейные размеры химического звена (Å); n — число химических звеньев; β — угол, образованный связью C—C с предыдущей связью C—C, ($\beta = 2\pi - \gamma$, где γ — угол валентности).

В этом выражении учтена заторможенность вращения, определяемая энергетическим барьером (V_0), а также зависимость среднеквадратичного расстояния между концами цепи ($\bar{r}$) от температуры (T). В связи с этим реальные молекулы полимеров в конден-

сированном состоянии представляют собой не случайно закрученные цепочки, а достаточно устойчивые конформационные изомеры. При этом каждая молекула может сочетать в себе участки с определенными конформациями (своего рода смесь поворотных изомеров). Еще большую устойчивость вытянутой форме цепных молекул придает способность полимеров в конденсированном состоянии образовывать первичные надмолекулярные структуры. Эта устойчивость еще более усиливается, когда в качестве молекулярных связей действуют водородные связи, что особенно характерно для таких природных полимеров, как целлюлоза и белки.

В очень разбавленных растворах (условиях, неблагоприятных для возникновения первичных надмолекулярных структур) возможно образование весьма компактных глобул, как это наблюдается, например, в белках. Последние особенно склонны к образованию глобул, т. е. компактному свертыванию цепи, опять-таки в результате проявления интенсивного внутримолекулярного взаимодействия, обусловленного, в первую очередь силами Ван-дер-Ваальса и водородными связями.

Вышеизложенное показывает, что только ограниченное внутреннее вращение в цепных молекулах полимера не может определять возникновение той или иной формы полимерных цепей. Проявление гибкости полимерных молекул определяется следующими факторами: величинами потенциальных барьеров ограниченного вращения звеньев друг относительно друга (интенсивность внутреннего теплового движения молекул, зависимых от природы полимера); степенью межмолекулярного взаимодействия (повышение ее способствует возникновению первичных надмолекулярных структур); температурными условиями, когда изменяются как потенциальный барьер вращения, так и интенсивность межмолекулярного взаимодействия.

Таким образом, при одних условиях молекулы полимера могут соответствовать вытянутой форме, при других — наиболее свернутой. Тем не менее, в принципе полимерные цепи всегда стремяться к образованию разнообразных свернутых форм (набору разнообразных конформаций). Последнее вытекает из цепного строения асимметричных образований, каковыми являются полимерные цепи, и существования в них, как и во всех других молекулах, внутреннего теплового движения. Однако тенденции полимерных цепей образовывать набор конформаций, которые вытекают из энтропийной природы гибкости, противостоит проявление внутримолекулярного и межмолекулярного взаимодействия.

В заключение следует сказать, что возникновение специфических свойств полимеров обязано трем особенностям их молекул, линейному, цепному строению и их гибкости.

Именно эти особенности приводят в полимерах к возникновению высоких прочностных свойств, больших обратимых деформаций, к способности полимеров образовывать нити, волокна

и пленки, к возникновению явления набухания вещества и характерных свойств растворов. В ряде случаев указанные особенности молекул в природных полимерах приводят к возникновению в них специфических биологически активных свойств.

ПРОТОПЛАЗМА КАК МНОГОКОМПОНЕНТНАЯ ПОЛИМЕРНАЯ СИСТЕМА

Элементарный химический анализ протоплазмы показал, что в ней содержится примерно 70% кислорода, около 18% углерода, около 10,5% водорода; в десятых долях процента — кальций, азот, калий и кремний; в сотых — фосфор, магний, сера, хлор, натрий, алюминий и железо и очень небольшие количества некоторых других элементов. Все эти элементы входят в состав ряда неорганических и органических соединений различной степени сложности.

Протоплазма любой растительной и животной клетки содержит около 75—85% воды, 10—20% белка, 2—3% липидов, 1% углеводов и 1% солей и других веществ, т. е. на 10^5 молекул воды приходится примерно 500—600 молекул неорганических веществ, 5—6 молекул белков, 50—60 молекул липидов и около 100 молекул других органических веществ. В табл. 3 приведено содержание основных веществ в некоторых организмах (A. Giese).

Таблица 3

Содержание различных веществ в животных и растительных организмах, в процентах к общему сырому весу (по Гизе)

Вещество	Бык (33 мес.)	Кукурузное растение (зрелое)	Яйцо морского ежа (Paracentrotus)	Медуза
Белки	16,73	1,8	15,18	0,67
Липиды	24,62	0,5	4,81	следы
Углеводы	—	17,5	1,36	следы
Соли (зола)	5,24	1,2	0,34	3,0
Вода	55,51	79,0	77,3	96,0

Несмотря на то, что вода составляет самую значительную часть клеточного содержимого, основные свойства протоплазмы определяются такими важнейшими природными химическими соединениями как нуклеиновые кислоты, белки, углеводы и липиды.

Нуклеиновые кислоты (НК) представляют собой сложные высокомолекулярные соединения, в состав которых входит остаток фосфорной кислоты, углевод, а также пуриновые и пиримидиновые основания. Молекулярный вес НК очень высок — от 6 500 000 до 13 000 000. Каждое звено молекулярной цепи

нуклеиновых кислот представляет собой нуклеотид, поэтому такие полимеры называются полинуклеотидами. НК отличаются друг от друга типом углевода, входящего в химический состав данной цепной молекулы, а также типами и характером чередования в цепи пуриновых и пиримидиновых оснований, являющихся боковыми группами таких цепей. Из углеводов, входящих в состав цепи полинуклеотидов, известны такие сахара, как рибоза и дезоксирибоза в циклических формах, а из пуриновых и пиримидиновых оснований — соединения, изображенные ниже как боковые группы цепных молекул.

Пиримидиновые основания (кетаформы):

Тимин (2,6-диокси-5-метилпиримидин) | Цитозин (2-окси-6-аминопиримидин) | Урацил (2,6-диоксипиримидин)

Пуриновые основания:

Аденин (6-аминопурин) | Гуанин (2-амино-6-оксипурин) | Гипоксантин (6-оксипурин)

Для дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), которая содержится, главным образом, в ядрах клеток, хромосомах животных организмов, строго повторяющаяся часть молекулы, состоящая из остатков фосфорной кислоты, молекул дезоксирибозы, двух пиримидиновых (тимин, цитозин) и других пуриновых (аденин, гуанин) оснований, характеризуется следующим химическим строением:

$$—O—P(=O)(OH)—O—\underset{H_2C}{CH}—\underset{O}{CH}—CH_2—O—P(=O)(OH)—O—\underset{H_2C}{CH}—\underset{O}{CH}—CH_2—$$

(R_1 (или R_3) и R_2 (или R_4) присоединены через группу CH, связанную с H_2C и O кольца)

где R_1—R_4 — пуриновые, или пиримидиновые основания.

Такая часть молекул является, по существу, химическим звеном полимерной цепи, однако всю молекулу в целом можно также рассматривать как природный сополимер, состоящий из следующих различных по своему химическому составу звеньев остатков мононуклеотидов, расположенных в строго регулярной последовательности в цепи:

```
                    C—NH2                                   C—OH
                C                                       C
           N         N                             N         NH
           HC        CH                            HC        C—NH2
                C                                       C
              N    N                                  N    N
              |                                       |
              CH                                      CH
         O  H2C   O                             O  H2C   O
         ||                                     ||
1) —O—P—O—CH—CH—CH2—                     2) —O—P—O—CH—CH—CH2—
         |                                      |
         OH                                     OH

                C—OH                                    C—NH3
         H3C—C      NH                           HC      N
            HC      C—OH                         HC      C—OH
                N                                     N
                |                                     |
                CH                                    CH
         O  H2C   O                             O  H2C   O
         ||                                     ||
3) —O—P—O—CH—CH—CH2—                     4) —O—P—O—CH—CH—CH2—
         |                                      |
         OH                                     OH
```

Нуклеиновые кислоты в комплексах с белками, известные под общим названием нуклеопротеидов, играют ключевую роль в процессах жизнедеятельности живых организмов. ДНК является тем первичным химическим материалом, который лежит в основе сложного и далеко еще не выясненного процесса передачи наследственных признаков при делении клетки, а следовательно, и всех процессов, связанных с размножением. По-видимому, ДНК является тем первичным биогенным полимером, который, возникая во вновь образовавшейся клетке, направляет синтез всех других специфических биогенных полимеров. Образующиеся вслед за этим рибонуклеиновые кислоты (РНК) участвуют далее в чрезвычайно сложном биохимическом процессе синтеза специфических белков, которые, в свою очередь, в роли ферментов обеспечивают все последующие процессы развития и обмена (рис. 31).

Таким образом, в последние годы было установлено, что нуклеиновые кислоты выполняют в вирусе, клетке и высокоор-

ганизованном организме кибернетические функции. В ДНК клеточных ядер и РНК вирусов растений зафиксирована вся генетическая информация, т. е. необходимые данные для синтеза белков. Результаты опытов по трансформации бактерий растворами чистой ДНК, по заражению бактерий с помощью ДНК, выделенной из фагов, по заражению растений с помощью РНК, выде-

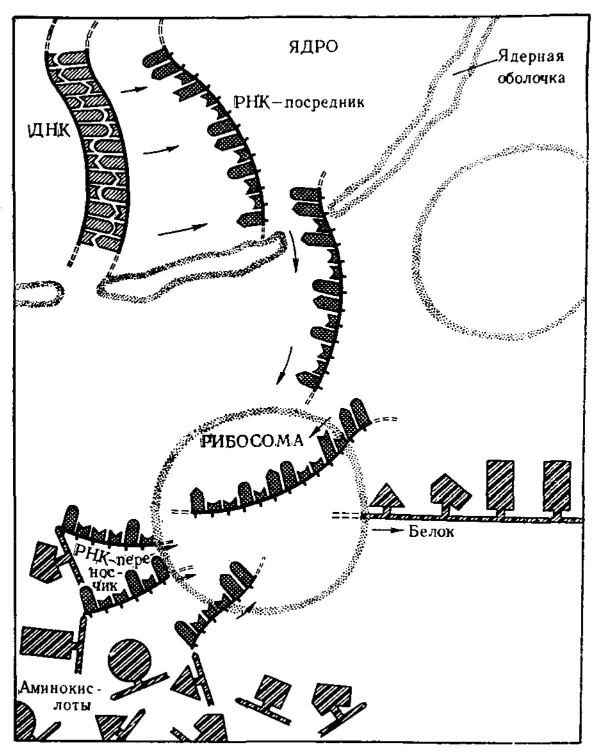


Рис. 31. Схема синтеза белка в клетке

ленной из вирусов, показывают, что именно макромолекулы ДНК и РНК являются носителями генетической информации.

Весьма сложным химическим строением характеризуются б е л к и, являющиеся продуктами поликонденсации аминокислот:

$$\underset{\substack{| \\ \mathrm{CH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \mathrm{H_2N} \quad \mathrm{COOH}}}{R_1} + \underset{\substack{| \\ \mathrm{CH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \mathrm{H_2N} \quad \mathrm{COOH}}}{R_2} + \ldots + \underset{\substack{| \\ \mathrm{CH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \mathrm{H_2N} \quad \mathrm{COOH}}}{R_n} \xrightarrow{-n\mathrm{H_2O}}$$

$$\xrightarrow{n\mathrm{H_2O}} \mathrm{H_2N{-}CH(R_1){-}CO{-}NH{-}CH(R_2){-}CO \ldots HN{-}CH(R_n){-}COOH}$$

Установленное Фишером (A. Fischer) наличие пептидной связи (— CO — NH —) в структуре белка привело в свое время к бурному развитию исследований, давших много ценного для познания природы белка.

По своему строению белки напоминают синтетические полиамфолиты. Существует, однако, и важное отличие — при синтезе в живых тканях природа создала то, что пока не исследовано в химии биополимеров — построила все макромолекулы данного белка одинаковыми по массе, по числу боковых групп и по чередованию вдоль цепи. Поэтому физическая химия белков в некоторых случаях более сходна с химией низкомолекулярных соединений, чем с физической химией синтетических полимеров, особенно когда речь идет о молекулярном весе и строении, так как в этих случаях не требуется рассмотрения распределений и средних величин.

Сочетание определенных типов аминокислот, а также строго регулярное их чередование в полимерной цепи обусловливает все многообразие белковых веществ в живых организмах. К настоящему времени выделено и изучено около 30 аминокислот, входящих в состав белков.

Многочисленные исследования показывают, насколько разнообразны типы аминокислот, входящих в состав молекулярной цепи того или иного белка, и насколько различны их количественные соотношения. Но уже в настоящее время успешно решается сложная задача — установление структурной формулы белка, т. е. порядка чередования всех аминокислот вдоль каждой из полипептидной цепи, а также нахождение всех «мостиков», соединяющих воедино цепи.

Структурная формула инсулина, адренокортикотропина, рибонуклеазы и белка вируса табачной мозаики (ВТМ) полностью выяснена.

Так, инсулин имеет молекулярный вес 5733, и его макромолекулы состоят из двух коротких цепей, соединенных друг с другом дисульфидными мостиками. Одна из полипептидных цепей содержит 21, а другая 30 аминокислотных остатков.

Структура рибонуклеазы оказалась более сложной. Молекулярный вес ее равен 13 683. Этот белок состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 124 остатка, соединенных четырьмя дисульфидными мостиками.

Частично решена эта задача для многих других белков, в частности, для цитохрома С, химотрипсина, миоглобина и гемоглобина.

Очень большая роль в осуществлении различных функций организма принадлежит *сложным белкам*, или *протеидам*. В зависимости от характера небелковых компонентов (простетических групп) сложные белки подразделяют на несколько подгрупп.

Наиболее интересной и важной группой из числа сложных белков являются *нуклеопротеиды*.

Нуклеопротеиды состоят из сравнительно простого и низкомолекулярного белка основного характера — протамина, или гистона, и высокомолекулярной простетической группы — нуклеиновой кислоты. Нуклеопротеиды входят в состав всех клеток живого организма, являются важной частью хромосом. К этому классу соединений относятся и молекулы-гиганты — вирусы, возбудители многих инфекционных заболеваний. Примером таких нуклеопротеидов может служить вирус табачной мозаики, продуцирующий на листьях табака образование белых пятен. Молекулярный вес его около 50 000 000. Частица вируса табачной

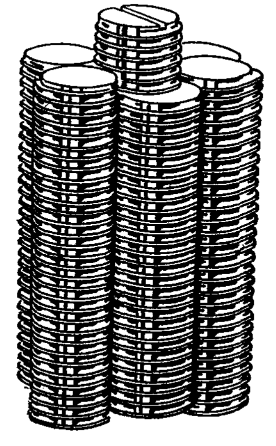


Рис. 32. Схематическое изображение поверхности вируса табачной мозаики (по Франклину)

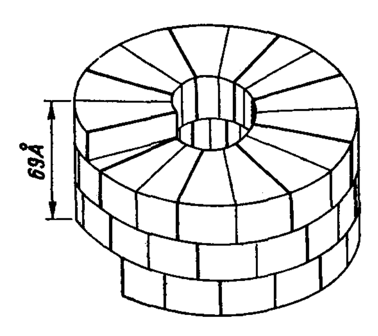


Рис. 33. Схематическое изображение структуры дископодобных субъединиц в ВТМ (по Шрамму)

мозаики состоит из 94% белка и 6% рибонуклеиновой кислоты. Согласно некоторым представлениям (H. Fraenkel — Conrat, A. Schramm), белковая часть вируса табачной мозаики слагается из ~2900 субъединиц — полипептидов с молекулярным весом около 18 000, которые соединены между собой вторичными связями. Белок при растворении в кислой среде (pH 3,5—6,6) распадается на субъединицы, которые вновь объединяются при стоянии раствора, при котором происходит образование белка с молекулярным весом около 100 000. Как превращается этот белок в полимер с молекулярным весом около 50 000 000, пока неизвестно. Видимо существенное значение при этом играют SH-группы.

Эта гигантская молекула, представляющая собой полый цилиндр, связывается затем с рибонуклеиновой кислотой, молекулы которой располагаются внутри цилиндра. Так представляют в настоящее время образование ВТМ. Характер связи РНК с белком различен: до 70% белка отделяется при мягкой обработке щелочью, остальные 30% не гидролизуются и в более жестких условиях. На рисунках дано схематическое изображение поверхности ВТМ (рис. 32) и структуры ВТМ (рис. 33).

В фосфопротеидах собственно белок соединен с фосфорной или пирофосфорной кислотой (эфирообразно) через гидроксильные группы аминокислот. Наиболее типичными представителями этой группы являются казеиноген молока животных, овивителин яиц, ихтилин рыбьей икры.

В хромопротеидах простетической группой является красящее вещество гем, представляющее собой соединение порфиринового ряда, содержащее металл. В гемоглобине (красящем веществе крови), который является переносчиком кислорода у позвоночных, гем содержит железо; в хлорофилле растений — магний; в гемоцианине, содержащемся в крови и гемолимфе некоторых беспозвоночных животных, гем содержит медь. Железо содержат и ряд других представителей этой обширной и важной группы белков, например, цитохром С — катализатор клеточного дыхания, каталаза и пероксидаза — важнейшие окислительные ферменты клетки.

В группу липопротеидов относят комплексы белка и липидов, близкие к белкам по растворимости, отношению к солям, способности к денатурации. Наоборот, комплексы, обнаруживающие свойства липидов, часто называют протеолипидами. Различия между обоими группами связаны, по-видимому, с разным пространственным расположением полипептидной и липидной частей. Среди липопротеидов можно выделить две группы веществ постоянного химического состава, характеризующихся определенными молекулярными параметрами. Это — α-липопротеиды, имеющие подвижность α-глобулина, содержащие 57% липидов и 43% белка с молекулярным весом 300 000 и размерами 300 × 50 Å и β-липопротеиды, имеющие подвижность β-глобулина и содержащие 77% липидов и 23% белка. Последние имеют молекулярный вес 1 300 000 и сферическую форму с диаметром 185 Å. Если у гемоглобина (представителя группы хромопротеидов) соотношения белковой и небелковой частей сохраняются постоянными при разных физиологических состояниях организмов, то у липопротеидов при изменении условий такого постоянства в соотношении обоих компонентов не наблюдается.

В настоящее время известно около 30 видов липопротеидов. В табл. 4 даны сведения о химическом составе разных по плотности групп липопротеидов плазмы человека (A. Oncley).

Если липопротеидов, отличающихся белковой частью, в основном только две группы (α и β), то имеющих разницу в липидном составе, значительно больше.

Связь между полипептидной цепочкой и гидрофобной липидной частицей, например, в липопротеидах крови осуществляется за счет слабых сил: солевые связи, водородные, силы Ван-дер-Ваальса, очень редко ковалентные химические связи. Подобные типы связей объединены под общим термином: адсорбционные

Таблица 4

Химический состав липопротеидов плазмы человека (по Онклею)

Плотность при 25° С	Концентрация, *мг/%*	% к общему количеству				
		пептиды	фосфолипиды	холестерин	эфиры холестерина	триглицериды
0,94	Разн.	2	7	2	6	83
0,98	150	9	18	15	15	50
1,03	320	21	22	38	38	10
1,09	80	33	29	23	23	8
1,14	380	57	21	14	14	5

связи или связи активированной адсорбции. Извлечение липидов полностью при обработке нейтральными растворителями при низкой температуре и при добавлении к эфиру поверхностно-активных веществ говорят в пользу такого типа связей.

В липопротеидах тканей ковалентные связи встречаются значительно чаще, а адсорбционные связи могут возникать самопроизвольно в процессе выделения из клеток липопротеида (артефакты).

Комплексы липопротеидов представляют собой коллоидные частицы, в структуре которых молекулы низкомолекулярных липидов переслоены высокомолекулярными молекулами белка. При этом гидрофобные части полипептидных цепей и липидов ассоциируются вместе и располагаются во внутренних частях общей структуры, а гидрофильная поверхность представляет собой мозаику различных ионных и полярных групп, принадлежащих как липиду, так и белку. В поддержании целостности такой структурной субъединицы липопротеида необходимо наличие значительного количества г и д р а т и р о в а н н о й воды. По-видимому, эта вода составляет основное количество так называемой с в я з а н н о й воды протоплазмы. Количество же последней составляет лишь около 4,5% всей воды протоплазмы (по Гизе).

Гипотетические схемы строения липопротеидов представлены на рис. 34.

В последнее время было показано, что важную роль в формировании липопротеидов играют, по-видимому, гликопротеиды, как стабилизаторы общей структурной субъединицы — комплекса липогликопротеидов.

Белки являются важнейшими веществами живой природы. Их центральная роль определяется тем, что белки являются ферментами, ведущими реакции обмена веществ, реакции синтеза одних соединений и распада других. При этом оказалось, что ферментативной функцией обладают как белки сложного многоклеточного организма, так и почти все белки отдельных живых клеток (например, микробы). Основным отличием ферментов

от катализаторов, используемых в промышленности, является их крайняя специфичность. В живой природе не образуется побочных продуктов: всякая реакция идет строго направленно и экономично. В настоящее время изучено множество ферментов и ферментативных реакций. Прямой путь изучения функциональности ферментов состоит в исследовании кинетики ферментативных процессов. Другой важнейшей функцией белков является структурная функция, или функция активного транспорта. Естественно,

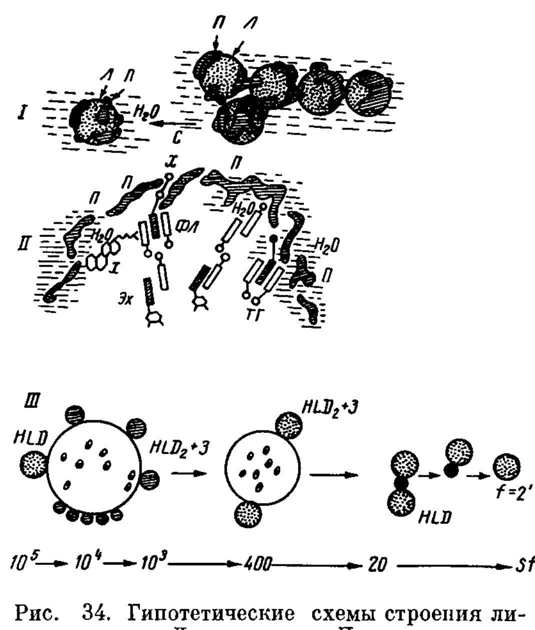


Рис. 34. Гипотетические схемы строения липопротеидов: *Л* — липиды; *П* — полипептидные цепи; *X* — холестерин; *ЭX* — эфиры холестерина; *ФЛ* — фосфолипиды; *ТГ* — триглицериды.

I — обозначено поверхностное расположение полипептидных цепей на липидной мицелле; *II* — схема составлена по Анфинсену; *III* — схема составлена по Линдгрену (показан распад *ЛП* под влиянием *ЛП*-липазы)

что все биохимические процессы, протекающие в живой клетке, должны быть разделены в пространстве и во времени. Клетка не является вместилищем, где перемешаны все метаболиты и ферменты, а разделена на множество органелл, защищенных липопротеиновыми мембранами от свободного проникновения растворенных веществ. Кроме того, подавляющее большинство ферментов находится внутри тех или иных органелл и поэтому все биохимические процессы локализованы в строго определенных местах.

Структурные белки клетки являются материалом, из которого строятся оболочки органелл клетки. Они же регулируют прохождение различных веществ внутрь этих структурных образований. При этом оказалось, что проницаемость веществ через подобные структуры — процесс, отличный от процесса обычной тепловой диффузии, идущей всегда по градиенту концентрации. В клетках этот процесс может идти и против градиента концентрации. Отсюда и понятие «активного транспорта» у белков.

Одна из функций белков — сократительная; превращение энергии химических реакций в механическую работу. В настоящее время сократительные белки найдены в форме мышц не только у высших организмов, но и у микробных клеток (жгутики), вирусов (хвостик бактериофага T_2) и ряда растительных клеток.

У высших организмов можно встретить специфические белки-переносчики, действие которых заключается в обратимом связывании и переносе определенных жизненноважных веществ. Примером этого может служить гемоглобин крови — переносчик молекулярного кислорода.

Существуют белки, осуществляющие защитную функцию против чужеродных веществ и клеток, обеспечивающие иммунитет. Подобного рода иммунологические реакции могут осуществляться, например, молекулами гамма-глобулина.

Рассматривая вышеперечисленные функции белков, необходимо подчеркнуть, что какую бы функцию белка мы ни взяли, будь то каталитическая и сократительная или строительная, или защитная иммунологическая мы всегда сталкиваемся со сложным проявлением взаимодействия всех уровней организации белковой макромолекулы. Только благодаря участию первичной, вторичной, третичной и т. д. структур, рассмотрение которых дается в другом разделе, возможно то многообразие и в то же время поразительная целеустремленность биологических процессов.

Важным классом природных полимерных соединений являются *полисахариды*.

Полисахариды подразделяют на две большие группы: *гомополисахариды* и *гетерополисахариды*. К гомополисахаридам относится большое число полисахаридов, входящих в состав «скелетной части» растений, составляющих их покрытие, вместилище для плодов, а также представляющих собой резервный запас углеводов в растении. К ним относятся наиболее широко распространенные и важные природные полимеры — *целлюлоза* и *крахмал*.

Целлюлоза, входящая в состав оболочек растительных клеток, является одним из простейших по своему строению неразветвленных гомополисахаридов. Установлено, что целлюлоза является глюканом и содержит β-глюкозидную связь. Вся цепь макромолекулы целлюлозы построена однотипно, т. е. все глюкозные остатки связаны друг с другом совершенно одинаково.

Целлюлоза (мономерное звено)

Молекулярный вес целлюлозы колеблется в пределах от 100 000 до 1 500 000, что соответствует степени полимеризации от 600 до 9000.

Такой огромный молекулярный вес целлюлозы придает ряд особенностей ее молекуле, что проявляется в ее известных физико-химических свойствах, в первую очередь, в большой склонности к межмолекулярной ассоциации. Особенности конформации полимерной цепи целлюлозы, имеющей вид вытянутой нити, винтообразно закрученной вокруг своей оси, облегчает межмолекулярное взаимодействие полимерных цепей силами водородных связей и вандерваальсовскими связями. Вследствие этого возникают прочные молекулярные агрегаты, имеющие характер продольных волокон, что и обеспечивает характерные механические (опорные) свойства целлюлозы.

Крахмал является резервным полисахаридом многих растений, накапливается в различных его частях. Это один из важных составных частей пищи, определяющий питательную ценность злаков, картофеля и других углеводных продуктов питания.

Детальное исследование крахмала показало, что он неоднороден, содержит фосфор и состоит в действительности из двух самостоятельных полисахаридов — амилозы (20—30%) и амилопектина (70—80%). При этом строение амилозы оказалось весьма близким к строению целлюлозы.

Разница между одними полисахаридами состоит в том, что в амилозе остатки глюкозы связаны не β-глюкозидной, а α-глюкозидной связью.

Амилоза (мономерное звено)

Молекулярный вес амилозы составляет около 56 000, что соответствует, примерно, 300 глюкозным остаткам в полимерной цепи.

Основной структурной единицей полимерной цепи амилопектина являются, как и в амилозе, остатки глюкозы, связанные

между собой в положениях 1—4 α-гликозидной связью, однако в молекуле амилопектина имеются глюкозные остатки, в которых свободные гидроксильные группы у С (6) отсутствуют (наличие ответвлений):

Амилопектин (мономерное звено)

Благодаря развитию конформационных представлений в настоящее время в приложении их к разрешению вопросов строения углеводов яснее обрисовывается значение конформации глюкозных остатков в полимерной цепи полисахарида для конформаций всей цепи в целом, и, следовательно, для всей физико-химической характеристики полимера.

Так, в молекуле целлюлозы глюкозное кольцо находится в такой конформации, которое придает полимерной цепи форму скрученной вдоль оси тонкой нити (форма «кресла»):

«Кресло»

В амилозе же глюкозное кольцо по стерическим причинам не может иметь такую форму и находится в ваннообразной конформации. Вследствие этого вся полимерная цепь приобретает изогнутую волнообразную форму, способную в определенных условиях свернуться в спираль (форма «ванны»):

«Ванна»

Близок по строению к амилопектину важнейший гомополисахарид животного происхождения — гликоген. Играя роль резерв-

ного полисахарида при избытке углеводов в пище, образуясь из избыточной глюкозы и откладывается в печени. При недостатке углеводов в пище гликоген распадается, и образующаяся при этом глюкоза поступает в кровь. В отличие от амилопектина гликоген имеет большее число разветвлений и, следовательно, более высокий молекулярный вес.

Другие наиболее важные гомополисахариды: маннаны, галактаны (агар-агар), фруктозаны, пентозаны, полиурониды. Среди полисахаридов, содержащих аминосахара, наиболее известен хитин (панцирь раков, насекомых).

Гетерополисахариды распространены в природе так же широко, как и гомополисахариды. В отличие от последних они особенно широко представлены в животном мире. Гетерополисахариды являются основой углеводных компонентов соединительной ткани (например, хрящей), входят в состав костей и различных слизей. В растительном мире они содержатся во многих соединительных тканях (гемицеллюлозы), камедях (гуммиарабик), слизях.

Гетерополисахариды входят в состав многих микроорганизмов, где они выполняют важные биологические функции. Гетерополисахариды составляют основу так называемых гликопептидов — сложных комплексов белков с углеводами. Гетерополисахариды, содержащие аминосахара и полипептидные цепи, играют важную роли при иммунитете, обеспечивая специфичность иммунологических реакций. Такие гетерополисахариды определяют групповую принадлежность крови.

Гетерополисахариды, о структуре которых имеются очень скудные сведения, по своему строению разделяются на две большие группы: неразветвленные гетерополисахариды с регулярной структурой (полимеры, в молекулах которых повторяется одна и та же комбинация моносахаридов) и гетерополисахариды с нерегулярным или регулярным разветвленным строением. Полного представления о строении полисахаридов этого типа еще не имеется, хотя именно они являются, вероятно, наиболее интересными с биологической точки зрения.

Гетерополисахариды сильно различаются по составу входящих в них моносахаридов. Чаще всего в качестве мономеров (моносахаридов) в них встречаются глюкоза, галактоза, глюкуроновая и галактуроновая кислоты, глюкозамин, галактозамин.

К важнейшим неразветвленным гетерополисахаридам с регулярным строением полимерной цепи относятся гиалуроновая кислота, хондроитинсерная кислота, гепарин.

Гиалуроновая кислота, являющаяся полимером глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, играет важную роль в процессах оплодотворения и в защите от проникновения в тело животного микробов. Она находится в стекловидном теле глаза, в полости суставов и составляет основу межклеточного вещества, цементирующего отдельные клетки.

Основа соединительной ткани (хрящ) содержит помимо некоторого количества белка хондроитинсерную кислоту, представляющую собой полимер N-ацетилгалактозамина, глюкуроновой кислоты и сульфата. Гепарин широко распространен в животном организме и был выделен из печени, тканей сердца и легких и из мышц. Он является природным антикоагулятором крови с очень сильным действием и играет поэтому важную роль. Гепарин содержит серу в виде остатков серной кислоты. Его полимерная цепь состоит из чередующихся остатков глюкозамина и глюкуроновой кислоты.

В настоящее время наибольшее внимание привлекают два класса производных углеводов: гликопептиды и гликолипиды.

Углеводные компоненты гликопептидов состоят из гексоз и их производных. Из крови выделено несколько десятков индивидуальных гликопептидов, чрезвычайно разнообразных по своим биологическим функциям. Среди них имеются гормоны (гонадотропин, эритропоэтин; гормон, стимулирующий образование фолликул), ферменты (церулоплазмин-лактаза, холинэстераза), а также ингибиторы и активаторы ферментов и «переносчики» гормонов. К гликопептидам относится ряд веществ, связанных с системой свертывания крови (фибриноген, протромбин), обладающие коронаросуживающим действием. Гликопептидами являются вещества, ответственные за серологическую специфичность (γ-глобулины, специфические вещества группы крови). Все без исключения гликопептиды, так же как и аминополисахариды, содержат гексозамины. Предполагают, что гексозамины являются связующими звеньями между пептидными и углеводными цепями в молекулах гликопептидов.

Соединения типа гликопептидов играют, по-видимому, весьма важную роль в функциях нервной системы, так как они широко распространены наряду с липоидами в нервной ткани, например, в ганглиях.

Изучение этого класса веществ только начинается. Исследование строения и функций таких сложных углеводосодержащих природных продуктов является проблемой недалекого будущего. Решение их поможет раскрыть тайны тончайших биохимических и биофизических процессов.

ПОЛИМЕРНЫЕ РАСТВОРЫ И СТУДНИ КОМПОНЕНТОВ ПРОТОПЛАЗМЫ

Прежде чем дать основные сведения о растворах и студнях (гелях) полимеров, необходимо уточнить некоторые основные понятия. В данном случае мы имеем в виду такие понятия, как гомогенность, гетерогенность и дисперсность.

Гомогенными системами называют системы, состоящие из одной фазы (понятие «однофазность»), а гетерогенными — системы, в которых число фаз равно по меньшей мере двум (понятие «многофазность»). Для того, чтобы назвать систему гетерогенной, необходимы два признака: различие свойств в отдельных областях пространства, занимаемого системой, и существование физических (статических) поверхностей раздела между этими отдельными областями.

Если в какой-либо среде в виде очень мелких частиц распределено другое вещество, то такая система называется дисперсной. Дисперсные системы могут быть как гомогенными, так и гетерогенными. В зависимости от степени раздробленности (степени дисперсности) дисперсные системы делятся на взвеси, суспензии, коллоидные системы и истинные растворы.

Однако определение типа дисперсных систем ранее производили в зависимости от абсолютного размера распределенных частиц. Согласно современной точке зрения в основу определения типа дисперсной системы положена соизмеримость распределенных частичек с размерами молекул данного вещества. Если распределенные частички очень велики по сравнению с размерами молекул, то такие дисперсные системы называются взвесями (суспензиями). Если распределенные частицы находятся в состоянии молекулярного раздробления, то системы называются молекулярными (истинными) растворами. Подобные системы устойчивы, не разделяются на фазы в течение длительного времени и при различных внешних воздействиях. Если размеры распределенных частиц больше размеров молекул, но меньше частиц взвесей, и если в такую систему для устойчивости добавляется еще один компонент — эмульгатор или стабилизатор, то такая система называется коллоидным раствором.

Под дисперсиями полимеров обычно понимают коллоидные системы, в которых дисперсной фазой является высокомолекулярное соединение.

Работами советского ученого химика Каргина с сотрудниками было показано, что типичные растворы полимеров являются равновесными, термодинамически устойчивыми, обратимыми системами, т. е. молекулярным (истинным) раствором.

Растворение полимеров носит характер самопроизвольного диспергирования. При этом истинные растворы могут образоваться только тогда, когда между компонентами имеется сродство, т. е. взаимодействие. В этом случае при непосредственном контакте компонентов последние самопроизвольно (без затраты энергии извне) диспергируются до молекул атомов или ионов. Ввиду больших размеров молекул полимеров вначале происходит проникновение молекул растворителя между отдельными звеньями молекул полимеров. В местах межмолекулярных связей образуются соль-

ватные оболочки из молекул растворителя. При этом ослабляются силы межмолекулярных связей отдельных участков цепи полимера, в результате чего происходит раздвижение звеньев цепи, а затем и цепей полимера (набухание полимеров).

Компоненты могут смешиваться в любых соотношениях (неограниченное смешение) или в определенных соотношениях (ограниченное смешение). В результате смешения образуется раствор определенного состава, т. е. определенной концентрации. Если внешние условия (давление, температура) неизменны, то концентрация истинного раствора остается постоянной во времени.

Истинный раствор всегда является однофазной системой. Эта фаза может быть отделена поверхностью раздела от другой фазы (осадка, другого раствора), но внутри самого раствора нет поверхностей раздела, т. е. система гомогенна.

Нарушение устойчивости растворов биополимеров приводит к процессам расслоения (высаливания, коацервации).

При этом коацервацией называется разделение раствора высокомолекулярного соединения на две фазы, одна из которых содержит большую часть растворенного вещества. Новая фаза, обогащенная растворенным веществом, называется коацерватом.

Частицы полимера, входящие в состав коацерватных капель, вероятно, отделены друг от друга тонкими гидратными оболочками (H. Bungenberg de Jong). В пользу этого предположения говорит обратимость процесса коацервации. С одной стороны, при уменьшении концентрации вещества, вызвавшего коацервацию, а также при изменении условий (pH среды или температуры) коацерватные капли исчезают и система переходит в однофазную. С другой стороны, изменение условий в сторону усиления дегидратации частиц вызывает разрушение коацерватных капель и выпадение растворенного вещества в осадок. Коацервация вызывается действием на растворы полимеров не только электролитов, но и таких дегидратирующих веществ, как спирт в смеси с небольшим количеством электролита (явление так называемой «простой коацервации»). Как правило, коацервация происходит при смешивании растворов двух полимеров, частицы которых несут электрические заряды противоположного знака («комплексная коацервация»).

Рассмотренные выше положения могут быть с определенными допущениями распространены на биологические системы. Так было показано, что во многих клетках растительного и животного происхождения (яйца морских животных, водоросль *Nitella*) основная масса протоплазмы находится в совершенно жидком состоянии, т. е. в форме молекулярного раствора. Однако имеется немало клеток, содержимое которых обладает высокой вязкостью. Она бывает наиболее велика в тех случаях, когда протоплазма сплошь заполнена зернистостями, гранулами и представ-

ляет густую суспензию мелких образований, разделенную тонкими перегородками (мембранами).

В другом случае высокие значения вязкости, если они не вызваны микроскопическими структурами, зависят от структурной вязкости концентрированных растворов биополимеров протоплазмы, способных давать студни (гели).

Подобные примеры показывают, что вязкость протоплазмы колеблется в довольно широких пределах. Даже в пределах одной клетки различные части протоплазмы существенно отличаются друг от друга. Как правило, эктоплазма, образующая поверхностно кортикальный слой протоплазмы, отличается значительно бо́льшей вязкостью, чем внутренняя масса эндоплазмы.

В большинстве случаев основная бесструктурная масса протоплазмы, обычно легко отделяемая при центрифугировании, представляет собой истинный молекулярный раствор биополимеров, а поверхностная эктоплазма образует типичный случай геля природных полимеров.

К важнейшим биополимерам живой протоплазмы, способным давать истинные растворы, относятся белки и нуклеиновые кислоты, которые как известно, являются сложными полиэлектролитами и их структура стабилизирована водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса. Подобное обстоятельство имеет большое значение при изучении их способности давать «in vitro» молекулярные растворы.

В растворе, например, белка имеются обычно как электрически нейтральные частицы, так и электрически заряженные ионы. Свойства растворов будут зависеть от количественного соотношения этих видов частиц.

В изоэлектрической точке, когда частички белка электрически нейтральны, его раствор обладает следующими свойствами: минимумом поверхностного натяжения, вязкости, осмотического давления; минимумом проводимости и набухания, максимумом светорассеяния.

Показано, что растворимость различного рода белков изменяется в широких пределах. Некоторые белки, например склеропротеины, нерастворимы в воде, в разбавленных растворах солей и большинстве обычных растворителей. Другие белки, встречающиеся в организованных структурах, растворяются только после экстрагирования липидов (разрушения липопротеинового комплекса клеток). Проламины, например глиадин пшеницы, растворимы только в спиртовых растворах. Альбумины растворимы в нейтральной дистиллированной воде, в то время как глобулины растворимы только в разбавленном нейтральном солевом растворе. Некоторые белки, например глутелины злаковых растений, растворимы только в кислом или щелочном растворе. В зависимости от внешних условий каждый отдельный белок может обнаружи-

вать изменение растворимости в широких пределах, причем различные белки по-разному реагируют на изменение внешних условий.

Установлено, что растворимость белка зависит от соотношения числа неполярных гидрофобных групп к числу полярных гидрофильных групп в молекуле, от их взаимного расположения и от результирующего дипольного момента. Заряженные полярные группы электростатически взаимодействуют друг с другом как внутри одной и той же молекулы, так и межмолекулярно, однако в воде эти силы благодаря высокой диэлектрической постоянной убывают и возникает повышающее растворимость взаимодействие между полярными группами и молекулами воды. Поэтому альбумины очень легко растворимы в воде, так как в этом случае взаимодействие между белком и растворителем сильнее, чем взаимодействие между молекулами белка. В то же время добавление к воде этилового спирта снижает диэлектрическую постоянную и вместе с тем приводит к замене части молекул воды. Поэтому те белки, которые хорошо растворимы в воде, в водно-спиртовых смесях растворяются хуже. Например, растворимость яичного альбумина или карбоксигемоглобина лошади в 25%-ном этиловом спирте при 5° C составляет лишь небольшую долю их растворимости в воде.

В результате взаимодействия между заряженными группами белковых молекул и ионами растворенных солей многие белки, очень плохо растворимые в чистой воде (так называемые эвглобулины), растворяются при добавлении к ней незначительных количеств нейтральных солей. Такое увеличение растворимости при добавлении соли было отмечено как особенность некоторых сывороточных глобулинов. Детальное исследование этого явления привело к установлению принципа ионной силы. Согласно этому принципу при низкой концентрации соли возрастание растворимости белков пропорционально ионной силе раствора.

Интересными оказались данные, которые показали, что добавление биполярного иона, например глицина, значительно повышает растворимость таких белков, как карбоксигемоглобин лошади и β-лактоглобулина.

Выше уже говорилось о том, что белки представляют собой многовалентные амфотерные вещества (полиамфолиты), содержащие положительно и отрицательно заряженные группы, число которых в каждом отдельном случае изменяется характерным образом в зависимости от величины pH. В отсутствии соли растворимость белка обычно является наименьшей при изоионном значении pH белка, когда суммарный заряд равен нулю и увеличивается при повышении и понижении pH. На рис. 35 показано влияние изменения величин pH и ионной силы на растворимость β-лактоглобулина. По мере увеличения ионной силы растворимость β-лактоглобулина возрастает как в изоионной

точке, так и при отклонении pH в любую сторону от нее. Эти результаты являются типичными для многих белков.

В случае же эдестина и сывороточного альбумина увеличение ионной силы вызывает снижение растворимости в более кислой по сравнению с изоионной точкой области. Это приводит к расширению кривой растворимости и заметному сдвигу величины pH, соответствующей минимуму растворимости, в кислую сторону. Такое положение объясняется образованием нерастворимой соли белка и находящегося в растворе аниона кислоты.

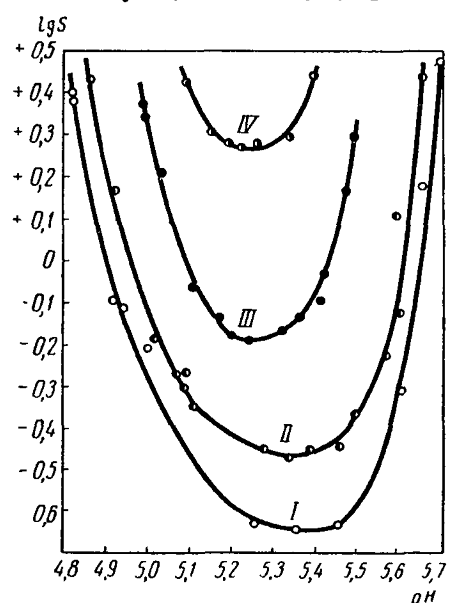


Рис. 35. Влияние pH и ионной силы раствора на растворимость β-лактоглобулина (по данным Гренвалла). По оси ординат ионные силы tg *S*). Кривая *I* соответствует ионной силе 0,001; кривая *II* — ионной силе — 0,05; кривая *III* — ионной силе 0,01; кривая *IV* — ионной силе 0,02

Влияние pH на растворимость альбуминов в водно-спиртовых смесях обнаруживает аналогичные закономерности, т. е. растворимость указанных белков минимальна при значении pH, соответствующем изоионной точке в воде.

Достаточно высокие концентрации нейтральных солей приводят к осаждению («высаливанию») белков из водных растворов.Это явление обусловлено уменьшением взаимодействия (гидратации) между молекулами воды и полярными группами белка.

Растворимость многих белков обычно растет с повышением температуры.

Комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, липидами, углеводами обычно слабо растворимы. Получение молекулярных растворов возможно только после разрушения исходного комплекса.

Сравнительно недавно было показано, что имеется широкая «безразличная» зона, в пределах pH около 4,5—10,0, в которой не наблюдается глубоких изменений природы белковых веществ. При выходе за границы этой зоны обнаруживаются резкие и необратимые переходы белковых молекул в денатурированное состояние, что выражается в увеличении вязкости, в изменении многих других свойств (растворимость, комплексообразование и др.). Установление подобной зоны у белков имеет общебиологическое значение, так как для большинства водных организмов

и для тканевых культур границы этой зоны являются границами жизни, при выходе за которые начинается гибель. Резкие сдвиги pH в кислую или щелочную сторону способствуют процессу свертывания белков, что влечет за собой резкие нарушения в структуре протоплазмы, приводящие к гибели клеток.

С другой стороны, отклонения от оптимальных pH влечет за собой потерю активности специализированных белков-ферментов, что сказывается на характере обмена веществ в живом организме.

Рассмотрим теперь современные представления о гелеобразовании в растворах биополимеров и строении гелей.

Под явлением гелеобразования вообще понимают зависящий от природы полимера, растворимости и температуры процесс непрерывного увеличения вязкости раствора полимера во времени, сопровождающийся непрерывным нарастанием эластических свойств и приводящий к затвердеванию всей системы в однородную нетекучую массу — студень или гель.

Полимерные гели могут быть получены как путем застудневания растворов, так и при набухании полимера в растворителе (например, в воде) в случае его ограниченной растворимости. Мы будем рассматривать только первый случай. Согласно современным представлениям, общим условием гелеобразования является ограниченная растворимость полимера в данном растворителе, причем к растворам полимеров применимо правило фаз. Было показано, что образование гелей связано с расслаиванием системы на две фазы в случае ограниченной растворимости полимера в данном растворителе. Следовательно, условие ограниченной растворимости является необходимым условием гелеобразования.

Представления о том, что образование межмолекулярных связей в растворах полимеров при гелеобразовании происходит за счет взаимодействия друг с другом групп полимера, плохо растворимых в данном растворителе, развиваются в работах многих исследователей и могут считаться вполне доказанными.

Специфическое влияние растворимости полимера на способность раствора к застудневанию проявляется и в том, что гелеобразование может наблюдаться как при понижении, так и при повышении температуры. Так, классический пример полимерных гелей — гели желатины (или коллагена) образуются при понижении температуры раствора. В соответствии с этим можно сказать, что если растворимость с понижением температуры уменьшается, то и гелеобразование происходит при понижении температуры, и наоборот.

Однако одного снижения растворимости полимера недостаточно для того, чтобы наступило гелеобразование.

Другим важным условием гелеобразования является наличие определенной концентрации раствора, характерной для каждой

данной системы полимер — растворитель. Существование критической концентрации связано с тем, что гелеобразование осуществляется при достижении определенного соотношения между числом возникающих при понижении растворимости внутри- и межмолекулярных связей. Известно, что в разбавленных растворах вероятность образования внутримолекулярных связей не зависит от концентрации раствора, в то время как число межмолекулярных связей резко возрастает с ростом концентрации. Таким образом, критическая концентрация, при которой начинается гелеобразование, соответствует началу преимущественного образования при понижении растворимости межмолекулярных связей. Эта концентрация была приблизительно подсчитана Ферри (A. Ferry) для растворов желатины в предположении, что пространственная структура геля представляет собой сетку, образованную путем соединения концов макромолекул между собой. Несмотря на заведомую грубость такого рассмотрения, найденное Ферри значение критической концентрации, равное 1%, соответствует фактической концентрации раствора желатины, при которой возможно гелеобразование.

Исходя из общего условия гелеобразования — частичной потери растворимости, легко объясняется и влияние полидисперсности полимера на характер гелеобразования его растворов. Полидисперсность определяет различие растворимости отдельных фракций полимера в данном растворителе, несмотря на их одинаковый химический состав. Поскольку в образовании пространственной структуры геля могут принимать участие молекулы различных молекулярных весов, то, очевидно, что более легко растворимые фракции будут затруднять процесс гелеобразования.

Следует отметить влияние на процессы гелеобразования и самой структуры макромолекулы. Так, в ходе гелеобразования может наблюдаться возникновение вторичных образований из упорядоченно расположенных друг относительно друга молекул. Уолкер (Y. Wolker), отмечает, что способность полимера к гелеобразованию в растворе связана с его способностью к кристаллизации. Если при изменении растворимости полимера в растворителе происходит слишком большое упорядочение в расположении молекул, то происходит выделение осадка, а не образование геля. Этим объясняется тот факт, что образующиеся при охлаждении, например, растворов полиэтилена студни имеют характер, резко отличный от обычных студней белков, например, желатины. Снижение степени упорядочения в расположении взаимодействующих групп вдоль цепи приводит к снижению упорядочения молекул друг относительно друга и снижает тенденцию к выпадению осадка, способствуя гелеобразованию.

Однако некоторая упорядоченность во взаимном расположении молекул является даже необходимой, так как способствует обра-

зованию в растворе вторичных структур, которое предшествует гелеобразованию. Последнее ярко выражено у многих белков.

Структура макромолекулы определяет способность к гелеобразованию также и потому, что последняя зависит от гибкости макромолекулы. Конформация полимерной цепи в растворе зависит от гибкости цепи и от ее взаимодействия с растворителем. В случае гибких молекул вязкость разбавленных растворов в плохом растворе будет ниже, а вязкость концентрированных растворов — выше, чем в хорошем растворителе. Для жестких молекул (например, белков) вязкость растворов в хорошем растворителе будет меньше, чем в плохом, так как развернутая форма цепи в плохом растворителе способствует образованию межмолекулярных связей. Отсюда следует, что критическая концентрация гелеобразования для жестких полимеров должна быть меньше, чем для гибких полимеров.

Все изложенное выше позволяет сделать следующий вывод об основных условиях гелеобразования: *гелеобразование происходит только в случае ограниченной растворимости полимера в растворителе*. Поэтому все те факторы, которые влияют на растворимость полимера, оказывают влияние и на процесс гелеобразования. Однако гелеобразование нельзя сводить только к потере растворимости. *Необходимым условием гелеобразования является образование непрерывной пространственной сетки макромолекул, взаимодействующих друг с другом*. В результате этого при понижении растворимости происходит именно гелеобразование, а не выпадение осадка. Всякое введение в раствор добавок, способствующих возникновению межмолекулярных связей, будет способствовать гелеобразованию. Наконец, способность к гелеобразованию тесно связана с цепным строением биополимеров, являющимся необходимым условием построения сплошной пространственной сетки геля, охватывающей весь объем системы.

Сам процесс гелеобразования можно условно разделить на две стадии. *Первая стадия характеризуется значительным увеличением вязкости системы, но в целом система еще сохраняет свойства, присущие растворам. Вторая стадия начинается с момента появления упругости, т. е. начала проявления свойств твердого тела*. В дальнейшем упругость постепенно нарастает и достигает определенного значения, определяемого условиями гелеобразования. С этой точки зрения процесс гелеобразования можно, очевидно, охарактеризовать как процесс постепенного возникновения в растворе вторичных образований макромолекул и последующего взаимодействия между ними с образованием сплошной пространственной структуры.

В этом смысле представляет интерес вопрос о природе связей, ответственных за гелеобразование. Этот процесс особенно подробно обсуждался в литературе применительно к гелям белков,

например, желатины, что связано со сложностью их химической природы. Действительно, в желатине возможно образование связей различных типов: электростатических связей между неполярными группами, между полярными группами, водородных связей с участием пептидных групп цепи и др. Было установлено, что электростатические связи играют незначительную роль в процессе застудневания, поскольку температура застудневания желатиновых растворов практически не зависит от величины pH.

На температуру плавления гелей желатины сильно влияет добавление таких веществ, как мочевина, ацетамид, слабое влияние оказывает введение неполярных добавок. Это позволило сделать вывод о том, что межмолекулярное взаимодействие в гелях желатины обусловлено образованием связей в первую очередь между полярными группами макромолекул. Согласно другой точке зрения гели желатины образованы за счет взаимодействия макромолекул по неполярным группам, так как полярные группы взаимодействуют с водой и образование связей между ними должно предполагать десольватацию, для чего нет оснований. Можно допустить образование связей между полярными группами и в полярном растворителе, но для этого необходимо, чтобы энергия связи полярных групп макромолекул друг с другом была больше энергии связи этих групп с молекулами воды. Указанные различия в точках зрения связаны с тем, что химическая природа желатины весьма сложна. Очевидно, однако, что в образовании гелей желатины могут принимать участие различные типы связей, в том числе и связи между некоторыми из полярных групп, присутствующих в желатине.

Таким образом, на основании рассмотрения существующих представлений о механизме гелеобразования в растворах полимеров мы приходим к заключению, что процесс этот заключается в образовании прочных межмолекулярных связей как локализованного, так и нелокализованного типа. При этом в формировании пространственной сетки существенную роль играет не взаимодействие отдельных молекулярных цепей друг с другом, а взаимодействие существующих в концентрированных растворах вторичных образований — агрегатов молекул или пачек молекулярных цепей.

Особый интерес представляет рассмотрение гелей с большим количеством ионогенных групп, в том числе гелей различных полиэлектролитов, в которых огромную роль играют электрохимические явления. Они приобретают особое значение в гелях полиэлектролитов, образованных гибкими макромолекулами с высокой плотностью зарядов. В этом случае изменение степени ионизации ионогенных групп приводит к значительным изменениям объема геля, обусловленным электростатическим отталкивательным взаимодействием одноименно заряженных групп. Так, например, в гелях или волокнах полиакриловой кислоты,

содержащих по одной COO^- группе в каждом звене цепи, можно вызвать обратимые удлинения в 8—10 раз путем смещения pH или замены солей натрия на менее диссоциированные соли бария. С этим явлением связаны широко распространенные модели мышцы, простейшая из которых сводится к следующему. Рассмотрим ниточку полиакриловой кислоты, где цепи имеют вытянутую форму. При подкислении раствора, содержащего нити полиакриловой кислоты, каждая полимерная цепочка будет стремиться свернуться в клубок, и вся такая ниточка будет сокращаться. Наоборот, если ниточку полиакриловой кислоты погрузить в раствор щелочи, то при образовании соли в такой ниточке возникнут заряды и полимерные цепочки, имея одноименно заряженные группы, будут стремиться вытянуться.

Не менее важную группу полиэлектролитов составляют так называемые трехмерные полиэлектролиты, т. е. сетки линейных молекул полиэлектролитов, соединенных химическими поперечными связями. При этом большое значение имеют эластичные гели в форме тонких мембран. В живом организме различные типы мембран способствуют избирательному поглощению и переносу разнообразных веществ, пространственной организации процессов обмена веществ, использованию и превращению различных форм энергии.

ПОЛИМЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ КОМПОНЕНТОВ ПРОТОПЛАЗМЫ

Под структурой обычно понимают взаимное расположение отдельных компонентов системы (атомов, молекул, ионов), которые определяют строение всей системы в целом. Различают следующие структуры полимеров:

Первичные структуры, или структуры цепных молекул полимеров (характер расположения атомных групп в химических звеньях и характер расположения и чередования этих звеньев в самой полимерной цепи).

Вторичные структуры, или микроструктуры полимеров (взаимное расположение и форма цепных молекул в полимере). Такого рода структуры определяют типы сочетаний надмолекулярного характера. Поэтому их часто называют первичными надмолекулярными структурами.

Надмолекулярные структуры или микроструктуры полимеров (разные типы сочетаний вторичных структур в полимере). Часто рассматривают их как субмикроскопические структуры, или вторичные надмолекулярные структуры.

В отличие от обычных линейных полимеров многие биополимеры, в частности, белки, благодаря сложности своего строения

и разнообразия действующих в них молекулярных сил, последовательно образуют несколько типов структур.

Первый тип организации — это уже рассмотренная нами полипептидная цепь, цепь главных валентностей, вдоль которой действуют ковалентные или химические связи. Затем между звеньями полипептидной цепи образуются водородные связи. При этом каждая пептидная группа может образовывать с другими, себе подобными две водородные связи типа:

```
                  H
                  |
          ~ C ~ N ~
            ‖
            O
            :
            H
            |
      ~ C ~ N ~
        ‖
        O
        :
        H
        |
  ~ C ~ N ~
    ‖
    O
```

Полипептидные цепи при этом будут стремиться уложиться таким способом, чтобы образовалось максимально возможное число водородных связей. Навязываемая ими спиральная структура макромолекулы называется обычно вторичной структурой белка.

В белках, как и в нуклеиновых кислотах, мы находим случай макромолекул с большими внутримолекулярными (нехимическими) силами (теплота образования одной только связи колеблется около 5 *ккал/моль*).

В стабилизации белковых и других молекул при помощи водородных связей между боковыми цепями рассмотренная выше конформация играет весьма существенную роль.

По-видимому, та же структура лежит в основе общеизвестной схемы Уотсона — Крика (Y. Watson, F. Crick) (рис. 36), предусматривающей парное расположение оснований нуклеотидов, например пары оснований аденин — тимин:

```
                                  H
                                 /
   CH3      O ...... H—N              N
     \     //           \          /    \\
      C—C                C—C            C—
     //    \            //   \\        /
   —C       N——H .... N       C—N     O
     \     /            \    /    \  / \ /
      N—C                C=N       C    
     /    \\            /           \\ /
    C      O           H              —
   // \                               |

      Тимин                     Аденин
```

Кроме того, в белках, являющихся полиэлектролитами, взаимодействие между заряженными аминогруппами и заряженными карбоксильными группами имеет также громадное значение для конформации цепей. Если эти группы находятся на достаточно близком расстоянии друг от друга, то невозможно

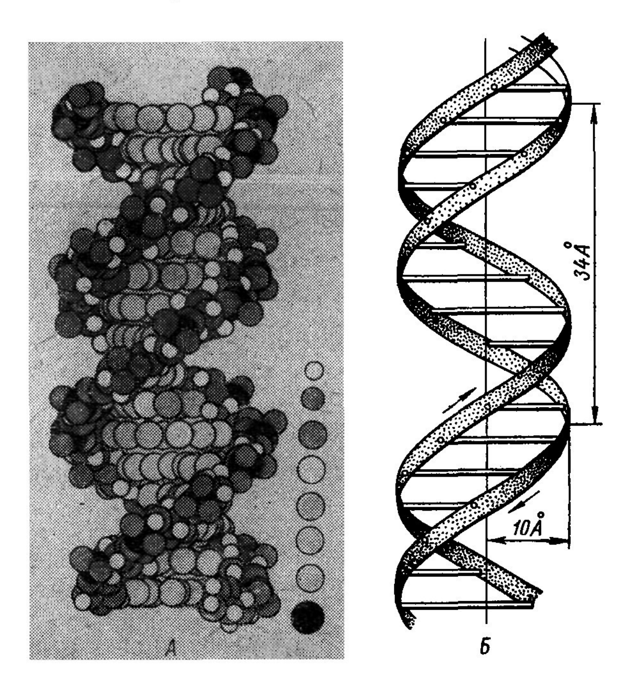


Рис. 36. Структура ДНК (по Крик-Уотсону): *А* — модель молекулы; *Б* — схема молекулы

провести различие между электростатическим взаимодействием (силы Ван-дер-Ваальса) и водородной связью в общей энергии взаимодействия.

И, наконец, третичная структура — это укладка спиральных и нерегулярных участков полипептидных цепей в компактную частицу (фибриллярные и глобулярные белки), рассмотрение которых дается ниже. Такая структура определяется вандерваальсовским взаимодействием боковых радикалов аминокислотных звеньев цепи, а также химическими мостиками, например дисульфидными сшивками.

В последнее время изучают особый тип организации — четвертичную структуру как результат локальных сил между функциональными группами, расположенными на поверхности белковых глобул. Такая структура может быть обусловлена, напри-

мер, кулоновским взаимодействием разноименно заряженных групп.

Нарушения нативной вторичной и третичной структуры белков, вызываемые разнообразными факторами (температура, pH, химические агенты и др.), приводят к процессу денатурации белков. Денатурация белков может быть обратимого и необратимого характера (А. Павлов). В случае необратимой денатурации белков организм гибнет. Обратимая денатурация белков, по мнению ряда авторов, лежит в основе жизнедеятельности протоплазмы (Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, А. С. Трошин).

Рассмотрим случаи возникновения первичных структурных образований в полимерах (образование глобулярных и фибриллярных структур).

Гибкость цепных молекул полимеров, как это излагалось ранее приводит к возможности осуществления любых конформаций молекул от предельно вытянутых линейных форм до плотно свернутых клубков.

Рассмотрим вначале случаи возникновения конформаций полимерных цепей, которые соответствуют форме наиболее плотно свернутых клубков — глобул.

Образование глобул возможно как для одной отдельно взятой цепной молекулы, например, в разбавленных растворах, в которых отсутствует какое-либо взаимодействие между молекулами, так и для некоторого количества молекул, сочетание которых приводит к возникновению глобулярных частиц типичного коллоидного характера.

В отношении устойчивости таких глобулярных структур коллоидных частиц полимеров можно сказать: если цепные молекулы какого-либо полимера достаточно жестки и если этот полимер способен кристаллизоваться, то устойчивость глобул невелика.

В результате взаимодействия цепных молекул друг с другом согнутые пачки цепей, составляющие глобулы, распрямляются и образуют фибриллярные структуры. Однако такие частицы в дисперсионной среде могут быть весьма устойчивы особенно в том случае, если при сворачивании одной или нескольких цепей в глобулу возникают прочные внутри и межмолекулярные связи, придающие устойчивость образовавшимся конформациям молекул. Так, например, такой тип устойчивых глобул характерен для молекул белков. В водной среде при этом возникают прочные внутренние связи между неполярными группами белковых молекул, а в неводной среде — между полярными группами, которые в значительной своей части являются водородными связями.

Рассмотрим теперь случаи возникновения первичных надмолекулярных образований фибриллярного типа.

До настоящего времени широко распространенное мнение на структуру аморфных полимеров сводилось к представлению о существовании в таких полимерах хаотически перепутанных цепных молекул (аналогично грубой модели молекулярного войлока). Однако это представление о структуре аморфных полимеров основывалось по существу на чисто умозрительных рассуждениях, не подтвержденных непосредственными наблюдениями таких структур, но простых и удобных для объяснения характерных свойств высокомолекулярных соединений. Указанные представления оказались первым и довольно грубым приближением к истинной картине структуры аморфного полимера.

В то же время хорошо известно, что даже в жидкостях существует хорошая упорядоченность близлежащих молекул, т. е. осуществляется ближний порядок, приводящий к возникновению вполне определенных ассоциаций. Правда, время их существования короткое: они быстро возникают в одном месте, быстро распадаются и вновь возникают в другом, что связано с характерными особенностями теплового движения в жидкости. Однако возникновение таких роев в растворах полимеров, особенно после испарения растворителя из растворов, когда подвижность полимерных молекул резко падает, приводит к длительному существованию таких ассоциатов (роев). Кроме того, сам порядок в роях молекул аморфных полимеров носит двойственный характер. По отношению к макромолекулам в целом осуществляется ближний порядок в системе, а по отношению к звеньям или подвижным отрезкам цепей — сегментам — может быть реализован уже дальний порядок. Иными словами, если исключить все многообразие весьма сложных кристаллических структур в полимерах, то в последних даже для их аморфного состояния следует предположить достаточно высокую степень упорядоченности в расположении макромолекул. И, действительно, прямые электронномикроскопические наблюдения, проведенные в последнее время, позволили установить характер первичных надмолекулярных структурных элементов в аморфных полимерах, что не имеет ничего общего с представлениями о системе с хаотически перепутанными цепями.

Выяснилось, что первичными надмолекулярными структурными образованиями в аморфных полимерах являются хорошо ориентированные пачки макромолекул, названные, как уже указывалось выше, *пачками цепей*. Упорядоченность (ориентация макромолекул в пачках) может доходить до весьма высоких степеней расположения осей симметрии самих молекул при отсутствии ориентации их боковых групп. Если же при этом осуществляется и строгая ориентация боковых групп, то имеет место фазовый переход, т. е. кристаллизация полимерного вещества.

Рассмотрим строение самой пачки, сочетание которых и представляет собой структуру аморфного полимерного вещества. Как

показало изучение таких пачек в электронном микроскопе, размеры их намного длиннее самих цепных молекул полимера и , следовательно, это не есть образования из нескольких сложенных параллельно друг другу макромолекул. Такой характер строения пачки показывает, что она может включать в себя много рядов цепей, в которых макромолекулы расположены последовательно друг относительно друга, причем концы молекул находятся в разных местах пачки. Схематическое изображение строения пачки дано на рис. 37.

Следовательно, цепные молекулы полимера связаны друг с другом в пачке в одно целое и их индивидуальный характер в существенной степени теряется. В том случае, если толщина пачки невелика, т. е. если она объединяет небольшое число макромолекул, то любая неоднородность в пачке вызывает внутренние перенапряжения, а отсюда и изгиб пачки. Поэтому при достаточной гибкости макромолекул, входящих в состав пачки, возможно возникновение согнутых и даже глобулированных пачек. Изложенное выше строение пачки позволяет сделать заключение о том, что свойства пачки мало зависят от молекулярного веса молекул, если, разумеется, последние достаточно длинны. Поэтому такие пачки, являясь первичными надмолекулярными структурами полимеров в их аморфном состоянии, в существенной степени ответственны за формирование свойств полимеров (механических и других).

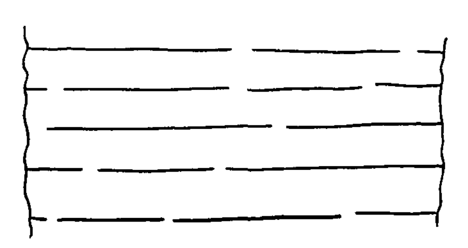


Рис. 37. Схематическое изображение строения пачки макромолекул

Таким образом, делая вывод из изложенного выше, можно сказать, что первичными структурными элементами полимерного состояния вещества являются две формы таких элементов: глобулы и пачки цепей.

Возникновение глобул из одной отдельно взятой цепной молекулы определяется прежде всего высокой гибкостью ее и отсутствием межмолекулярного взаимодействия с другими молекулами, что хорошо реализуется в разбавленных растворах полимеров. Сочетание таких глобул или согнутых пачек в одну крупную глобулярную частицу приводит к образованию коллоидных систем; устойчивость формы такой системы зависит от ряда условий (ионного состава среды и др.).

Возникновение пачек из молекул полимера определяется проявлением межмолекулярного взаимодействия в полимерных цепях: оно аналогично образованию роев в жидкостях с той лишь особенностью, которая характерна для больших цепных молекул

полимеров. Эта особенность заключается в высокой устойчивости таких первичных надмолекулярных структурных образований.

Вполне понятно, что чем жестче полимерные молекулы и чем сильнее межмолекулярное взаимодействие в таких молекулах, тем выше способность полимеров к пачкообразованию и к сочетанию их в более сложные вторичные надмолекулярные структуры. Этим объясняется большое разнообразие вторичных надмолекулярных высокоориентированных структур в таких аморфных полимерах, какими являются целлюлозы и некоторые фибриллярные белки, нуклеопротеиды, в которых межмолекулярное взаимодействие осуществляется водородными связями и которые являются типичными жесткоцепными полимерами.

В то же время полимеры с наиболее гибкими цепными молекулами наименее склонны к пачкообразованию.

Можно себе представить, что такие полимеры в аморфном состоянии характеризуются структурами, наиболее близкими к системе перепутанных молекул, хотя дальнейшие исследования в этой области могут существенно изменить такие представления, если допустить возможность проявления высокой гибкости пачек из молекул таких полимеров.

Рассмотрим характеристику м и к р о с т р у к т у р биополимеров, т. е. молекул структур, описывающих взаиморасположение и форму цепных молекул полимерных веществ.

Рассмотрим также физические явления структурообразующих процессов аморфных полимеров в конденсированном состоянии, т. е. в однокомпонентных системах, исключив из этого рассмотрения описание химических процессов, которые также могут приводить к структурным изменениям вещества, как это имеет место при переходе некоторых линейных полимеров в сетчатые в результате воздействия тепла или введения некоторых низкомолекулярных веществ, взаимодействующих с активными группами или участками двух цепных молекул и соединяющих их при этом силами химических связей (процессы «вулканизации»).

Физические явления, приводящие к возникновению различных типов микроструктур в линейных биополимерах, характеризуются по существу протеканием двух физических процессов: о р и е н т а ц и о н н ы х и р е л а к с а ц и о н н ы х. Первые обусловлены во всех случаях воздействием механического поля; вторые обязаны тепловому воздействию, происходящему в результате теплового движения кинетических сегментов и цепей.

Таким образом, как правило, ориентационные и релаксационные процессы протекают в биополимерах во взаимнопротивоположных направлениях, т. е. всякому растяжению полимера, например актомиозиновой нити, под влиянием деформирующих усилий сопутствует после снятия нагрузки сокращение линейных размеров образца. Правда, в отдельных случаях возможно сочетание

обоих указанных процессов, при котором ориентационные и релаксационные процессы протекают в одном направлении, т. е. релаксационные процессы содействуют увеличению линейных размеров образца.

Рассмотрим ориентационные явления в биополимерах. Как известно, при наложении механического поля простые аморфные тела в том случае, если они состоят из асимметричных молекул или асимметричных структурных элементов, способны приобретать анизотропию физических свойств, обусловленную возникновением ориентационных процессов. Естественно, что чем выше асимметрия молекул, тем выше эти ориентационные эффекты. Известно также, что после снятия механического поля восстанавливаются исходные изотропные физические свойства, т. е. исчезает явление ориентации. Однако, возможны и такие случаи, когда приложенные деформирующие усилия приводят к такому перемещению частиц в аморфном теле, при котором они уже не смогут вернуться в исходное положение равновесия, и тело будет необратимо деформировано, а возникшая анизотропия свойств сохранится в течение весьма длительного времени. Легко понять, что под влиянием деформирующих усилий возникновение анизотропии свойств тела будет тем резче, чем выше асимметрия его молекул. Следовательно, это явление в наибольшей степени проявляется в полимерах, большие асимметрические молекулы которых легко ориентируются под действием направляющей силы.

В биополимерах происходят структурные превращения, изменяющие весь комплекс физико-механических свойств. Устойчивость возникающих структур, обусловленных протеканием ориентационных процессов, зависит от условий ориентации цепных молекул полимера и от скорости релаксационных явлений, приводящих в конечном итоге к дезориентации цепей.

Скорость релаксационных процессов при этом определяется степенью межмолекулярного взаимодействия в биополимерах, т. е. химической природой вещества. В то же время повышение температуры окружающей среды или осуществление процесса набухания полимера, понижающего вязкость вещества, в значительной степени повышает скорость релаксационных процессов. Здесь особо следует отметить весьма интересный ход течения релаксационных явлений в жесткоцепных полимерах, например в целлюлозе, отличающихся весьма большими размерами механических сегментов. В таких полимерах ориентационные эффекты тотчас после снятия нагрузки при тепловой обработке образца вначале резко возрастают, а затем, после определенного максимума, также резко падают. Известны также и другие чрезвычайно интересные случаи самопроизвольного удлинения, связанные опять-таки с протеканием релаксационных явлений в жесткоцепных полимерах.

Рассмотрим вкратце макроструктуру биополимеров, описывающую взаиморасположение вторичных структурных образований или областей, отличающихся их микроструктурными характеристиками. Для биополимеров в конденсированной фазе изучение макроструктуры полимеров представляет собой весьма сложную и трудную экспериментальную задачу, особенно для гибкоцепных полимеров.

Характеристику макроструктур в биополимерах в конденсированной фазе удается обнаружить прямым наблюдением таких структур, используя метод получения реплик и их фотографирование в электронном микроскопе.

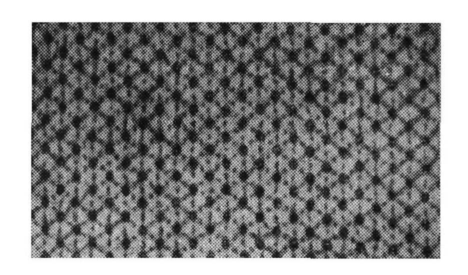


Рис. 38. Мышечная фибрилла. поперечный срез в электронном микроскопе

При этом подробное изучение надмолекулярных структур, особенно в жесткоцепных полимерах, которые в силу жесткости своих цепных молекул весьма склонны образовывать такие структуры, имеет большое значение для понимания механических и других свойств биополимеров. В самом деле, возникновение в полимерах даже первичных надмолекулярных структурных образований — пачек цепей, в значительной степени снижает роль самих цепных молекул в формировании свойств всего тела. В теле начинают уже проявляться свойства, обусловленные поведением самих пачек, их расположением и их формой.

Возникновение из таких пачек более крупных вторичных надмолекулярных образований фибриллярного типа вносит, в свою очередь, несомненно дополнительные особенности в формирование всех свойств биополимеров.

Наличие структур, обладающих всеми вышеперечисленными особенностями, характерно для самых разнообразных биологических систем. В ряде элементов клеток и тканей живого организма имеется необычная упорядоченность строения. На рис. 38 приведен электронно-микроскопический снимок поперечного среза мышечных фибрилл, на котором видна идеальная гексагональная упаковка, свидетельствующая о высокоориентированном состоянии молекулярных цепей, приближающегося к кристаллическому состоянию.

Биологические системы выделяются часто исключительно четко выраженной периодичностью вдоль пачек цепей. Пример такой периодичности показан на рис. 39. Такая повторяемость структур вдоль пачки цепей белка (коллаген) может быть результатом регулярной смены различных типов укладки молекулярных цепей.

Однако повышенная упорядоченность биологических полимеров проявляется не только в пачечных аморфных полимерах.

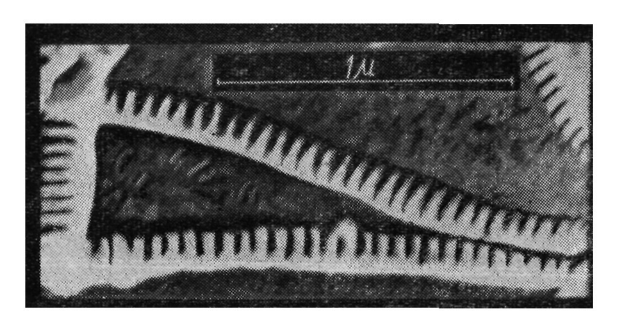


Рис. 39. Структура коллагеновых волокон

Глобулярные кристаллы белков в значительной степени выделяются своей упорядоченностью по отношению к другим кристаллам, построенным из полимерных глобул.

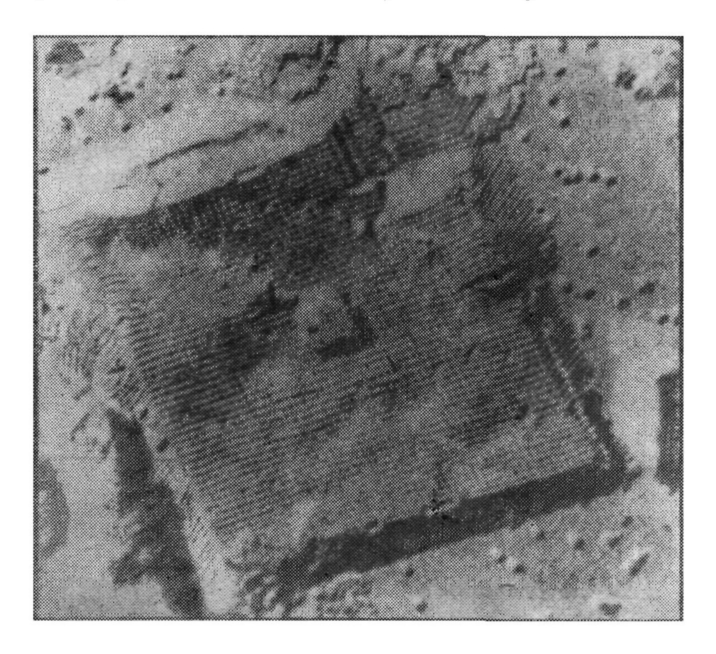


Рис. 40. Электронно-микроскопический снимок вируса табачной мозаики

Электронно-микроскопическая фотография вируса табачной мозаики приведена на рис. 40. Исключительная упорядоченность

носит не чисто кристаллический характер, ибо в этом случае можно говорить лишь об упорядоченности молекул вплоть до групп атомов, но не отдельных атомов.

Но и в этом случае необходимы, в общем, основные условия кристаллизуемости полимеров, т. е. регулярное строение цепных молекул полимера, соответствующая конформация полимерных молекул и, наконец, сегментальная подвижность цепных молекул полимера.

ТИПЫ И МОРФОЛОГИЯ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ПРОТОПЛАЗМЫ

Во всякой клетке можно визуально выделить цитосому, или цитоплазму, ядро и оболочку. В цитоплазме, как и в ядре, удается различить ряд образований; некоторые из них можно наблюдать непосредственно (визуально, под микроскопом), а другие лишь после соответствующей фиксации и окрашивания.

Однако фиксация и гистологическая обработка живых клеток может вызвать появление в них структур, не существовавших при жизни. Эту возможность необходимо всегда учитывать при анализе гистологических картин, наблюдаемых на фиксированных препаратах. Решающей проверкой реальности той или иной структуры, обнаруженной на фиксированном препарате, является только наблюдение соответствующего образования в живой клетке. Подобным образом при благоприятных условиях оптического наблюдения удалось, например, подтвердить существование фигуры веретена в делящейся клетке. Микрофотография в ультрафиолетовых лучах позволила обнаружить в живой клетке нуклеиновую кислоту, входящую в состав ядерного хроматика T. Caspersson. Аналогичные данные получены при исследовании клеток инфракрасной оптикой (В. В. Лепешкин).

На рис. 41 представлена современная схема строения клетки, основанная на наблюдениях в электронном микроскопе.

Оказалось также, что клетка разделена на множество органелл, защищенных белковыми, часто липопротеиновыми мембранами, наделенными ферментативной активностью, и препятствующими свободному проникновению растворенных веществ. Внешняя оболочка клетки также является липопротеиновой мембраной с весьма селективной проницаемостью.

Большинство ферментов в клетке находится внутри тех или иных органелл. Поэтому и все биохимические процессы локализованы в определенных местах. Продолговатые, довольно крупные тела (длиной около 0,5 *мк*) — митохондрии содержат в себе ферменты окисления и окислительного фосфорилирования, т. е. катализаторы реакций, в которых запасается энергия, потребляемая клеткой. Маленькие круглые образования (диа-

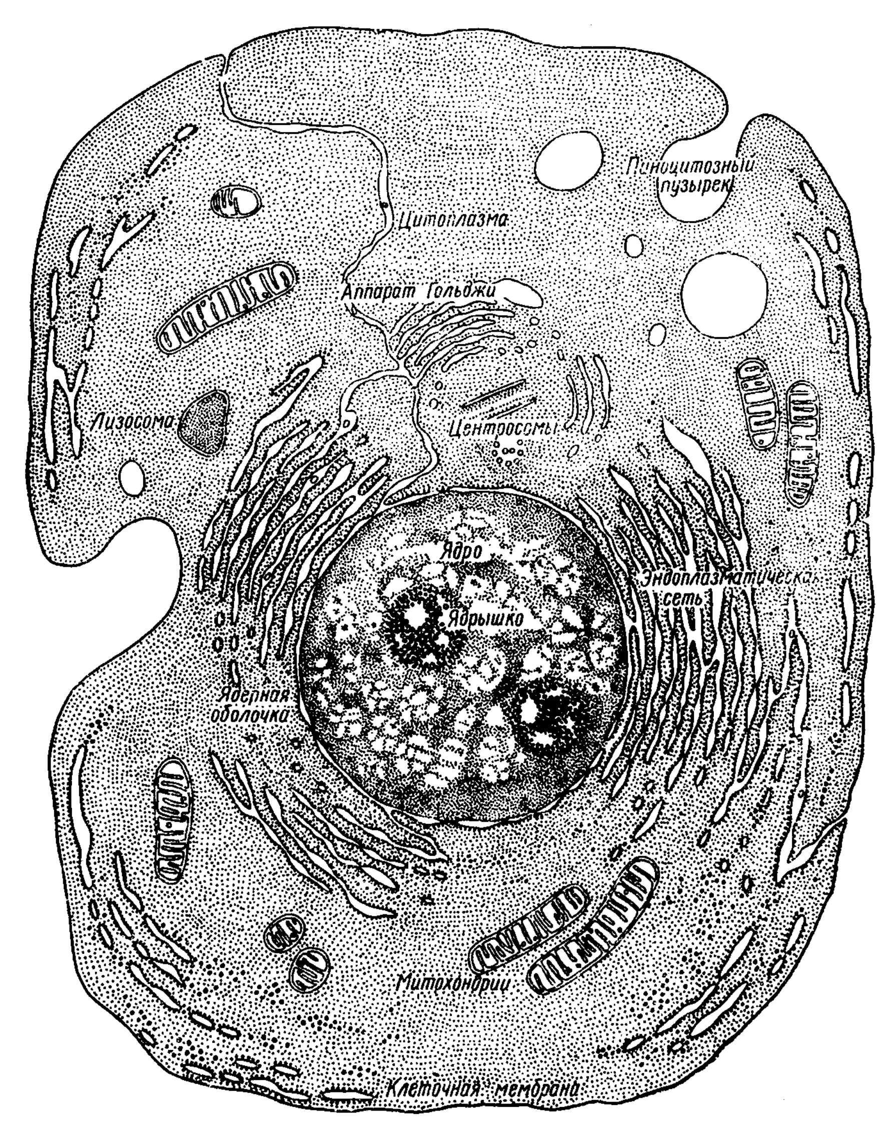


Рис. 41. Современная схема строения клетки, основанная на наблюдениях в электронном микроскопе (по Браше)

метром 150—200 Å) — **микросомы**, или **рибосомы** содержат в себе ферменты, необходимые для синтеза белков.

Химический состав различных протоплазменных структур приведен в табл. 5.

Таблица 5

Химический состав структурных элементов клетки, в % (по Сисакяну)

Структурные элементы	Белки	Липиды	Нуклеиновые кислоты
Животные клетки			
Ядра	47—72	10—46	26—44
Митохондрии	65—70	25—30	0,5
Микросомы	32—61	36—51	2,6—17
Растительные клетки			
Пластиды	41—55	18—37	0,3—3,5
Митохондрии	38—45	25—38	0,6—6,5
Микросомы	22—40	48—56	0,8—1,0

Детальная картина структурных элементов протоплазмы была получена путем изучения ультратонких срезов (до 100—150 Å) при помощи электронной микроскопии. Таким путем была установлена сложная структурная организация митохондрий. Митохондрии, как оказалось, окружены мембраной, отделяющей их от протоплазмы, и, словно «корабль», разделены перегородками на ряд отсеков с поперечным сечением в 200—300 Å. На рис. 42 дано схематическое изображение упорядоченного расположения молекул липидов и белков в митохондриях.

Детали структуры митохондрий исследовали методами электронной микроскопии тонких срезов неповрежденных тканей в лабораториях Шестранда (F. Sjöstrand), Палада (G. Palade) и других ученых. По схеме, предложенной Шестрандом, эти органеллы окружены внешней двухслойной мембраной и, кроме того, содержат двухслойные пластинчатые поперечные структуры (названные Паладом «кристами»). Эти мембраны, которые легко отделяются в фрагментированной форме, содержат 30—40% липидов (большей частью фосфолипидов). Как было показано Шестрандом, размеры двухслойных мембран приблизительно соответствуют размерам двух мономолекулярных слоев молекул белка, разделенных двойным слоем ориентированных молекул липидов; аналогичное строение имеют и кристы.

В основном веществе митохондрий содержатся растворимые белки, ферменты, электролиты и нуклеотиды, которые легко переходят в окружающую органеллы среду при механических или осмотических разрывах мембран. Результаты ряда иссле-

дований показывают, что большинство ферментов цикла Кребса и окисления жирных кислот содержится либо в мембранах, либо в пространстве между кристами. При этом последние легко освобождаются в растворимой форме при разрушении мембраны.

Ленингером (A. Lehninger) было показано, что в мембранах одной митохондрии печени крысы может содержаться до нескольких тысяч ансамблей дыхательных ферментов. На один ансамбль приходится обычно 12 молекул белка с молекулярным весом 10^{+6}. Поэтому можно считать, что средний вес частиц одного ансамбля дыхательных ферментов, вместе с его «наполнителем» — белком или липидом — может достигать примерно $7 \cdot 10^{-7}$ *г*. Все это свидетельствует о том, что митохондриальную мембрану нельзя считать просто инертной оболочкой, скорее — это очень сложная структура, в которой весьма специфическим образом распределены ансамбли дыхательных ферментов, т. е. эти ансамбли образуют саму основу мембранной структуры, в которой могут происходить избирательные изменения проницаемости и явления активного переноса. Сами сокращения митохондриальной мембраны похожи на конфигурационные изменения в молекуле миозина, сопряженные также с использованием энергии АТФ.

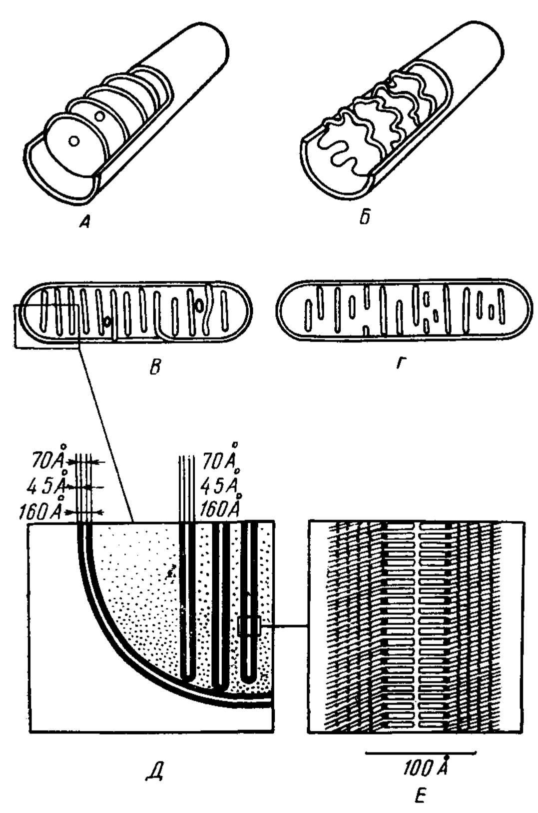


Рис. 42. Схема внутреннего строения митохондрий

Митохондрию часто называют силовой станцией клетки. В ней образуются по три молекулы АТФ на каждую пару электронов, освобождаемых при окислении ДПН-Н и сукцината — продуктов лимоннокислого цикла и окисления жирных кислот.

В растительных клетках функции митохондрий выполняют пластиды (хлоропласты, содержащие хлорофилл; хромопласты,

содержащие различные пигменты; лейкопласты, содержащие запасные вещества, например, зерна крахмала). Хлоропласты представляют собой образования, окруженные внешней мембраной и содержащие ряд внутренних мембран (около 130 Å каждая).

Из гомогенатов печени и поджелудочной железы удалось выделить фракцию субмикроскопических частиц, осаждаемых в сильных гравитационных полях. Клод (A. Claude) назвал эти частицы фракцией «мелких гранул», а затем *микросомной* фракцией. Указанная фракция оказалась богатой РНК (50—60% всей РНК клетки). Эта фракция составляет около 15—20% клеточной массы и, вероятно, главнейшую часть основной цитоплазмы. Выделенные частицы имеют субмикроскопические размеры от 100 до 150 Å и больше.

Детальное исследование микросомной фракции позволило выявить три основных компонента: *мембрану эндоплазматической сети*; рибосомы, прикрепленные к указанной мембране; содержимое *вакуолей* — аморфное или мелкозернистое образование. При этом бóльшая часть РНК содержится в плотных частицах (рибосомах). Белок, фосфолипид, гемохромоген составляют основу мембранной части микросом. Исследования последних лет показали, что рибосомы связаны с синтезом белка.

Если митохондрии осуществляют первичные превращения энергии в клетке, то более мелкие органеллы — рибосомы служат центрами образования ферментов. Последними к этому списку органелл клетки были причислены лизосомы. Это — органеллы, представляющие собой крошечные мешочки, содержащие каплю «активного сока», способного расщеплять большинство компонентов живой материи почти так же, как это происходит в желудочно-кишечном тракте высших животных. По выполняемой ими функции лизосомы можно поистине назвать пищеварительной системой клетки. Они, по-видимому, играют роль в таких важнейших процессах, как оплодотворение яйцеклетки и старение клетки и тканей, а также при ряде заболеваний. Весьма интересны свойства лизосомной мембраны. Ферменты, содержащиеся в лизосоме, не действуют на ее мембрану, хотя при освобождении они способны переварить всю клетку. Не исключено, что растворение клеточного содержимого и смерть клетки, наступающие вслед за разрывом мембраны, играют определенную роль в процессах развития некоторых животных и в ряде дегенеративных явлений.

В цитоплазме клетки можно выделить так называемый *аппарат Гольджи*, или *внутренний сетчатый аппарат*. Последний представляет собой сетчатые, зернистые или неправильной формы структуры, почти всегда локализованные в одном определенном месте. Основу этого образования составляют, по-видимому, липопротеиновые комплексы. В веществе Гольджи показано отсутствие аскорбиновой кислоты, ДНК и цитохромоксидазы. Сам аппарат Гольджи состоит из следующих морфологи-

ческих компонентов: уплощенных мешков, имеющих на срезе вид плотно расположенных параллельных мембран; скоплений плотных пузырьков (около 600 Å); крупных прозрачных вакуолей. Предполагают, что между секрецией и аппаратом Гольджи существует определенная связь.

Помимо вполне оформившихся субмикроскопических структур клетки, каковыми являются митохондрии, пластиды, рибосомы и другие образования, живая протоплазма содержит ряд клеточных включений (параплазма).

Некоторые из этих клеточных включений непосредственно связаны с питанием клетки (гликоген, капельки жира — в животных клетках, крахмал — в растительных клетках). В других случаях параплазма является продуктом жизнедеятельности клетки и накапливается в ней, а затем выводится в виде отбросов или используется другими клетками. Примером могут служить капельки муциногена слизистых клеток или гранулы секреторных клеток. И наконец, многие катаболические процессы в клетке могут проявляться в виде накопления инертных веществ, например, кристаллов и пигментов, которые во многих случаях служат признаками старения или дегенеративных процессов.

В начале этого раздела нами были приведены примеры структур мембранного типа в митохондриях, микросомах и других органеллах. По своему строению мембраны в организме следует рассматривать как сочетание избирательно растворяющих (гомогенных) и пористых мембран Булл (H. Bull). Во всех случаях основным элементом таких мембранных структур являются два монослоя белковых молекул (около 25 Å), между которыми расположен бимолекулярный слой липидов (55 Å). В природе встречаются многочисленные примеры липопротеидных систем — от растворимых липопротеидов крови и тканевых жидкостей до высокоорганизованных многослойных систем. Детально изучены в этом отношении миелиновые оболочки нервных волокон, наружные сегменты или фоторецепторы сетчатки (палочки и колбочки) и хлоропласты.

Миелиновая оболочка представляет собой липопротеидную мембрану, окружающую осевой цилиндр нервного волокна (аксон). Количественные эксперименты Шмидта показали, что белковые и липидные слои расположены концентрически вокруг аксона. По его данным, миелиновая оболочка представляет собой сложную надмолекулярную плоскостноориентированную структуру, образуемую радиально ориентированными бимолекулярными слоями липида и чередующимися концентрическими слоями белков. При этом липиды оказались трех типов: фосфолипиды, холестерин и цереброзид (соотношение их в структуре соответственно 2 : 2 : 1; рис. 43).

В палочках и колбочках сетчатки имеется также липопротеидная структура, специально предназначенная

для восприятия света. Шмидтом было высказано предположение, что для этих образований характерно чередование поперечно ориентированных белковых слоев с липидными молекулами, расположенными вдоль оси фоторецептора.

Для субмикроскопических (надмолекулярных) биологических структур характерна чрезвычайно высокая специализация действия каждого элемента структуры, вследствие чего выполнение

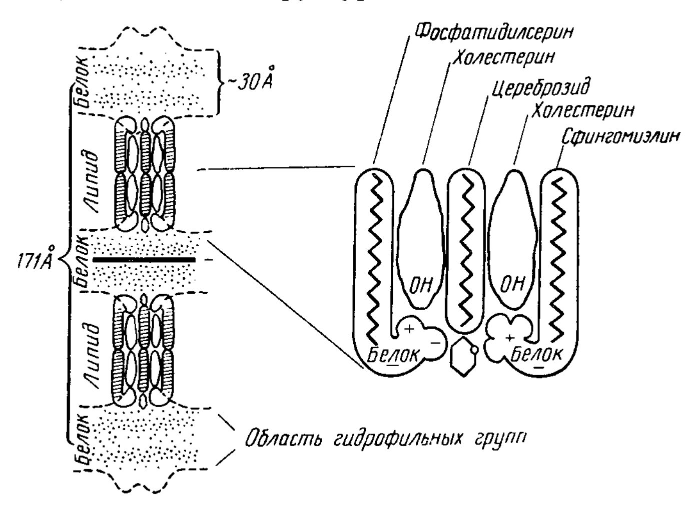


Рис. 43. Схема строения и химический состав миэлиновой оболочки нерва

физиологической функции обеспечивается лишь в рамках сложных многокомпонентных структур. Нарушение их целостности ведет к нарушению координации процессов обмена веществ или к их прекращению (А. Г. Пасынский).

РОЛЬ ФИЗИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ КОМПОНЕНТОВ ПРОТОПЛАЗМЫ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

В живых клетках большая часть протоплазмы находится, как правило, в жидком состоянии. Это говорит о том, что многие высокомолекулярные соединения, в основном белки и нуклеиновые кислоты, находятся в протоплазме в растворенном состоянии.

Такое состояние живой протоплазмы (яйца ряда морских беспозвоночных, многие растительные клетки) характеризуется вязкостными свойствами, которые лишь немного превышают вязкостные свойства обычной воды. Подобным низким значениям вязкости протоплазмы обычно соответствует отсутствие эластичностных свойств.

Однако эктоплазма, образующая поверхностный кортикальный слой протоплазмы, отличается по своим физико-химическим свойствам от внутренних слоев протоплазмы — эндоплазмы (значительная вязкость, эластичность). Это происходит от того, что внешний кортикальный слой протоплазмы характеризуется набором разнообразных биополимеров, в основном липопротеиновых комплексов и полисахаридов, создающих сетчатые структуры, способных к ограниченному набуханию (гели или студни). Нечто подобное имеется и во внутренних слоях протоплазмы многих клеток, когда она сплошь заполнена зернистостями и представляет густую суспензию мелких зернышек (коллоидных и субколлоидных частиц), разделенных лишь тонкими промежуточными прослойками. Такой же результат получается при наличии сильно развитой фибриллярной структуры, образующей в клетке твердый остов. Пример особенно плотной консистенции цитоплазмы дает парамеция, которая имеет в несколько тысяч раз большую вязкость, чем вода.

Подобно основной массе протоплазмы (цитоплазме) ядро также отличается значительным непостоянством своего агрегатного состояния как у разных клеток, так и особенно в разные периоды жизни клеток. У некоторых простейших оно оказалось плотным, похожим на обычный студень. Однако в покоящихся, неделящихся тканевых клетках содержимое ядра, за исключением плотных ядрышек и оболочек, представляло собой раствор, легко переходящий в студень (гель) при повреждении.

Свойство полимерных компонентов протоплазмы изменять свое агрегатное состояние под влиянием ряда факторов (механических, химических и др.) получило название т и к с о т р о п и и (thixis — прикосновение, tropo — поворачиваю). Явления тиксотропии наблюдаются в растворах вируса табачной мозаики (ВТМ), лиюзина и других, обладающих асимметричными частицами, а также в протоплазме клеток.

Раздражая иголкой тело малых лимфоцитов, Петерфи (K. Peterfi) наблюдал быстрое разжижение их протоплазмы, но она вскоре уплотнялась вновь. То же самое констатировали при раздражении иголкой тела мелких амеб. В свете тиксотропии становится вполне понятным старое наблюдение Кюне (W. Kühne), которому удалось видеть, как вдоль мышечного поперечнополосатого волокна лягушки продвигалась нематода с такой же легкостью, как в обычной жидкости. Ранее это явление считалось доказательством жидкого состояния протоплазмы мышечного волокна. В настоящее время можно сказать, что нематода при своем передвижении, механически воздействуя на «тиксотропную субстанцию» мускульного волокна, вызывала превращение его в золь (т. е. раствор), а золь после прохождения через него нематоды структурировался в студень. Особенно ярко тиксотропные явления наблюдаются при клеточном делении (см. главу 13).

Было показано, что при митозе ядерное вещество конденсируется в плотные вязкие хромосомы, а цитоплазма уплотняется вокруг центросом, образуя так называемую «атмосферу». Движением иглы микроманипулятора в приступающей к митозу клетке можно произвести тиксотропное разжижение волокнистых структур, образующих атмосферу. Через некоторое время после этого исчезнувшая атмосфера появляется.

Вязкость цитоплазмы, возрастая после оплодотворения (или искусственного партеногенеза), достигает своего максимума перед образованием веретена деления. После этого снова наступает разжижение, вязкость основной массы цитоплазмы падает, по-видимому в связи с обеднением ее полимерным веществом, уплотняющимся в сферу. Новое возрастание вязкости наступает к концу митоза, перед дроблением клетки. Интересно, если активность клетки и ее возбуждение обычно сопровождаются увеличением вязкости, то действие наркотизирующих средств (эфир, новокаин и др.) приводит в зависимости от концентрации нарк тиков либо к падению вязкости протоплазмы (малые концентрации), либо к повышению вязкости (большие концентрации). Последнее нередко заканчивается необратимой посмертной коагуляцией содержимого протоплазмы.

Многих исследователей часто занимал такой вопрос — почему при тиксотропном разжижении протоплазма не расплывается в воде и тем самым не приводит организм к смерти. Ранее пытались объяснить нерастворимость протоплазмы явлением поверхностной конденсации. Негели — (K. Negeli) — автор этих работ — основывался на результатах опытов с раздавливанием клеток в окрашенном растворе. Выдавленная протоплазма (из корневого волоска водяного растения *Hydrocharis*) образовывала комки, причем в некоторых из них оказывались капельки захваченного окрашенного раствора. Эти комочки обнаруживали осмотические свойства и такую же непроницаемость к ряду красок, как и нормальная клетка. Отсюда им был сделан вывод о том, что вытекающая из клетки протоплазма образует на своей поверхности новую оболочку со свойствами полупроницаемой мембраны. Рамсден считал, в частности, что эта оболочка возникает в результате адсорбции белка на поверхности голой капли протоплазмы на границе протоплазма — вода. Считалось также, что адсорбционное накопление белка вызывает его поверхностную коагуляцию.

Гейльбрун (L. Heilbrunn), на основании своих опытов на яйцах иглокожих и на инфузориях (stentor) пришел к убеждению, что для поверхностной конденсации протоплазмы необходимо присутствие ионов кальция. Из раздавленных объектов в изотоническом растворе хлористого натрия или даже в морской воде, из которой кальций был удален осаждением, «протоплазма свободно растекается, не выделяя оболочки». Исходя из этого и своих дальнейших опытов, Гейльбрун приходит к заключению, что действие кальция

при поверхностной конденсации протоплазмы по функции аналогично действию его при свертывании крови и что процесс поверхностной конденсации («реакции поверхностной преципитации «протоплазмы»)— весьма сложный биохимический процесс.

В настоящее время в этой связи получило широкую известность учение о к о а ц е р в а т а х. При этом исходят из положения, согласно которому протоплазма находится в жидком состоянии, но не смешивается с водой благодаря особым внутренним физико-химическим условиям т. е. благодаря наличию дисперсной гетерогенной системы, где дисперсной фазой являются биополимеры протоплазмы, а дисперсионной средой — вода.

Физико-химические свойства коацерватов в ряде отношений напоминают свойства протоплазмы. Согласно А. И. Опарину, коацервация имела большое значение для пространственного отделения и организации полимерных веществ в истории возникновения жизни на Земле. Однако при этом следует заметить, что само явление коацервации ни в коей мере не может рассматриваться как специфическое свойство протоплазмы клеток, так как оно присуще также и небиологическим системам.

Вообще агрегатное состояние протоплазмы, будь то раствор или студень, может подвергаться значительным изменениям как под влиянием разнообразных внешних воздействий (ионы солей, температура, электрический ток и др.), так и в результате протекающих в клетке нормальных физиологических процессов, например клеточного деления. Можно сказать, что клеточные процессы сопровождаются значительными изменениями агрегатного состояния протоплазмы, в основе которых лежат нефазовые переходы студень $\rightleftarrows$ раствор.

Согласно Гейльбруну, в основе этих переходов, являющихся по-видимому отражением жизнедеятельности протоплазмы, лежат, как мы уже говорили выше, процессы комплексообразования ионов кальция с белками клетки.

Как утверждает автор, в момент, «когда клетка подвергается действию различных факторов — тепла, холода, механического раздражителя, электрического удара, ультрафиолетовых лучей и т. п.,— ее кортикальный слой разжижается (распад комплекса: кальций — белок) и при этом освобождается кальций, который переходит внутрь клетки. При этом ультрафиолетовые лучи разрывают карбоксильную связь, соединяющую кальций с белком, а электрический ток вызывает обычную диссоциацию протеината кальция с выделением иона кальция. Проникая внутрь клетки, кальций активирует фермент типа тромбина. В результате этого наступает реакция свертывания протоплазмы или, во всяком случае, некоторой ее составной части. В мышечном же волокне результатом такой реакции свертывания является сокращение волокна, а в яйце морского животного реакция свертывания приводит к образованию миотического веретена».

По-видимому, в основе переходов раствор ⇄ студень в клетке существенную роль играет не только комплексообразование низкомолекулярных ионов с полимерными соединениями типа белка, но и характер взаимодействия полимерных молекул друг с другом при различных физиологических состояниях организма. Действительно, переходы от вязкого жидкого состояния (молекулярного раствора) к студнеобразному имеет место в различных жидкостях, входящих в состав живых существ и представляющих растворы разных полимеров.

Подобные превращения вызываются нестойкостью в протоплазме полимерных молекул, т. е. изменчивостью конфигурации их цепей, а также образования местных (локальных) связей между наиболее активными группами студнеобразующих молекул.

Такие изменения обратимы, ибо только в этом случае сохраняется жизнь. Необратимые изменения, которые могут быть связаны с разрушением биополимеров, приводят к гибели организма.

Можно думать, что высокомолекулярным соединениям принадлежит решающая роль в осуществлении жизненно важных функций протоплазмы.

Вся живая протоплазма состоит в основном из больших полимерных молекул. Так, свыше 80% химических компонентов высушенных растений приходится на их долю. Тело животного, если не считать воды, почти наполовину сложено из важнейшего биополимера — белка. Наши мышцы на 80% построены из белков (без воды).

Одним из самых интересных свойств полимеров является их способность образовывать совершенно разные вещества, несмотря на одинаковый или почти одинаковый химический состав. Например, древесина и крахмал — полисахариды и построены они из одних и тех же мономерных звеньев — глюкозы. Однако эти мономеры по-разному собраны в древесине и крахмале. Кровь и рога животного, в основном, белки (вернее, смеси белков), но пропорции разных типов составляющих их мономеров — аминокислот — в этих веществах разные, и форма молекул у белков крови и белков рога — различна: глобула и фибрилла.

В природе существует огромное количество тех же биополимеров — белков. Только в крови удалось обнаружить на сегодняшний день около 300 белков, имеющих разные свойства благодаря своему строению и структуре и характеру агрегатного состояния в протоплазме. Индивидуализация в биополимерах достигает весьма высоких степеней. Например, установлены различия в свойствах альбуминов плазмы у различных людей и даже у одного и того же индивида в разные моменты времени. Работы В. Н. Ореховича указывают на чрезвычайную индивидуализацию природных полимеров, играющих важную роль в организмах. Кроме всего этого, индивидуализация наиболее важных биополимеров

(белков, липоидов, нуклеиновых кислот) обусловлена также «стереометрическим расположением атомных групп (основные биополимеры оптически активны), а также тем, что в макромолекулах всегда в той или иной мере осуществляется заторможенное внутреннее вращение вокруг одинарных связей цепи, приводящее к появлению различных конформаций» (М. В. Волькенштейн).

Итак, разнообразие больших молекул — полимеров, состоящих из одних и тех же частей, достигается: различными количественными соотношениями мономеров, разным порядком их чередования или различным способом их соединения между собой в макромолекулу, разным способом «упаковки» больших молекул или различным расположением их цепей в пространстве.

Необходимо указать еще одно очень важное свойство биополимеров — которые (прежде всего белки, нуклеиновые кислоты) представляют собой полиэлектролиты. Подобные системы способны менять свою конформацию, сокращаться или растягиваться, т. е. совершать механическую работу при изменении либо рН среды, либо окислительно-восстановительного процесса. Последнее — наиболее веро̆ятный процесс для биологической системы, например, для сокращения волокон в организме, где изменения рН среды, по-видимому, не происходит. По мнению Риземана (A. Resemon), подобные явления могут иметь место при мышечном сокращении, в результате процессов ферментативного фосфорилирования и дефосфорилирования; в частности, они возможны на нитях белка — активна — в мышечном волокне. Весьма вероятно, что биологические процессы авторепродукций макромолекул, передачи наследственных признаков и функционирования «генов» имеют механическую природу.

Биологические процессы, развивающиеся в клетках организма, в значительной мере определяются, по-видимому, свойствами природных высокомолекулярных соединений. Наличие определенных первичных структур их обусловливают жизненно важные функции протоплазмы. Так, для естественных органических соединений класса полисахаридов и белков разнообразие в геометрической конфигурации молекул обусловливается теми функциями, которые несут эти вещества в живом организме. Вещества с асимметрически построенными молекулами, т. е. цепной нитевидной, линейной формой их (фибриллярные структуры), находятся в растительных и животных клетках в качестве основных элементов структуры. От этих веществ зависит прочность, крепость всего сложно построенного живого организма. Целлюлоза, например, является основным веществом структуры растительных организмов; коллаген и белки сухожилий — веществом структуры животных организмов.

В то же время вещества, которые должны быть легко переносимы, имеют, как правило, шарообразные глобулярные молекулы (глобулярные структуры), дающие не очень вязкие, свободно

передвигающиеся по организму растворы. К ним можно отнести гемоглобин, РНК-переносчик (растворимая РНК) и многие другие жизненно важные молекулы.

Белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды в сочетании с другими более простыми веществами, составляя основу клетки, в своих же взаимоотношениях и изменениях обеспечивают проявления ее жизненных функций: роста, движения, размножения и других.

Биополимеры представляют собой материал, из которого природа смогла рационально построить на основе относительно небольшого числа малых молекул все многообразие биологических структур. Полимеры придают живому веществу необходимую стойкость и в то же время подвижность, обеспечивают возможность работы организма, переводя химическую энергию в механическую. Благодаря огромным размерам своих молекул (вернее, их протяженности) и находящейся в них информации (ДНК) полимеры обеспечивают направленное течение биологических процессов.

ГЛАВА V

ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Под проницаемостью понимают способность клеток и тканей пропускать воду и растворенные в ней вещества. Эта способность не одинакова у различных клеток и тканей и по-разному проявляется для различных веществ.

Проблема проницаемости имеет большое значение в физиологии обмена веществ, в вопросах распределения веществ между клетками и тканевыми жидкостями, возникновения биоэлектрических потенциалов, в патологии водного и минерального обмена и др. В то же время весьма велико ее значение и для токсикологии и фармакологии, так как для оценки терапевтического эффекта недостаточно констатации одной лишь фармакодинамической активности,— лекарственное вещество должно так же хорошо проникать в клетки и ткани. Это справедливо и для ядов, применяемых в сельскохозяйственной энтомологии, для защиты растений и т. д.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ

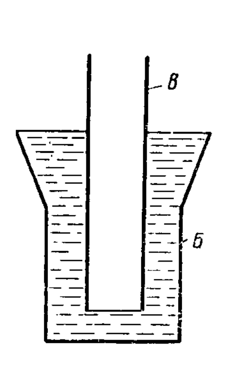
В настоящее время для изучения и оценки проницаемости применяются следующие методы:

1) объемные (плазмолитические, плазмометрические, гемолитические); 2) методы, основанные на применении красителей, в том числе и цветных индикаторов; 3) химические; 4) изотопные методы.

При работе объемным методом клетки обычно помещают в чистые гипертонические растворы исследуемых веществ и наблюдают затем за кинетикой сжатия и последующего восстановления исходного объема клеток. При работе с эритроцитами наблюдают за увеличением их объема и гемолизом. С целью объективной регистрации этих процессов в настоящее время применяют: а) центрифугирование взвеси клеток и визуальное определение их суммарного объема при помощи гематокритов; б) определение динамики изменения светопропускания методом фотометрии (рис. 44); в) исследование изменений показателя преломления клеток и суспензионной жидкости.

К недостаткам объемного метода следует отнести то, что он применим, в основном, лишь для ограниченного круга объектов (крупные клетки водорослей, эритроциты), и то, что он не применим при работе с высокими концентрациями веществ.

Применение второго метода (метода красителей) ограничено вследствие трудности обнаружения этих веществ в клетках при относительно низких концентрациях и в силу токсичности их при более высоких концентрациях. Кроме того, определяющим условием обнаружения красителя в клетке является его накопление (аккумуляция), которая зависит не только от степени проникновения молекул красителя в клетку, но и от их связывания белками и нуклеиновыми кислотами внутриклеточного содержимого.



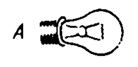


Рис. 44. Схема прибора для определения процента гемолиза: *А* — лампа; *Б* — гемолизирующий раствор; *В* — зрительная труба; *Г* — фотоэлемент

Наиболее надежны химические методы, основанные на непосредственном анализе состава внутриклеточного содержимого, особенно для крупных растительных клеток (*Nitella*, *Valonia*, *Halicystis* и др.).

Огромный сдвиг в изучении клеточной и тканевой проницаемости произвело применение меченых атомов (радиоактивных и отчасти стабильных изотопов). Указанный метод дал возможность: а) исследовать проницаемость клеток и тканей на целом живом объекте, не смещая при этом их исходное стационарное состояние, б) детально изучать кинетику проникновения вещества, не ограничиваясь произвольно выбранными интервалами времени и используя при этом низкие концентрации вещества, не изменяющие исходного состояния объекта. Метод меченых атомов позволил изучить проницаемость клеток и тканей не только для молекул чужеродных веществ, но и для соединений, входящих в состав клеток и тканевых жидкостей самого организма (вода, минеральные ионы). При помощи метода меченых атомов оказалось возможным четко отдифференцировать поток вещества из окружающей среды в клетку от потока того же вещества из клетки во внешнюю среду. В последние годы изотопным методом была с неопровержимостью установлена проницаемость протоплазмы для таких необходимых для жизни веществ как ионы калия и натрия, глюкозы, аминокислоты и др.

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ

В основе проникновения веществ в клетку лежит процесс диффузии, математическую трактовку которого дал Фик (1955). По закону Фика, скорость диффузии $\frac{dm}{dt}$ прямо пропорциональна

градиенту концентрации $\left(\frac{dc}{dx}\right)$ и площади поверхности (s), через которую осуществляется диффузия:

$$\frac{dm}{dt} = -Ds\frac{dc}{dx}. \qquad (5.1)$$

Коэффициент пропорциональности D в уравнении (5.1) носит название константы диффузии.

Скорость проникновения веществ в клетки определяется по формуле, предложенной Коллендером и Берлундом (Collander, Bärlund)

$$\frac{dm}{dt} = -ks(C - C_0), \qquad (5.2)$$

где $C - C_0$ — разность концентраций вещества между клеткой и средой,

k — константа проницаемости.

Проникновение вещества может происходить и в направлении, противоположном концентрационному градиенту при наличии другого градиента, противоположно направленного, например электрического.

При исследовании проницаемости следует постоянно учитывать роль метаболических процессов и в обеспечении концентрационного градиента между клеткой и средой. Так, включение поступающего в клетку аниона фосфора в молекулы нуклеотидов, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов и фосфолипидов приводит к снижению концентрации неорганического фосфата в клетке и тем самым поддерживает градиент этого аниона между клеткой и средой. Важную роль в накоплении веществ, особенно красителей, в клетке играет и химическая адсорбция.

Направление потока веществ не остается раз навсегда постоянным: оно может измениться на обратное при нарушении соотношений между процессами синтеза и распада важнейших высокомолекулярных компонентов протоплазмы. Так, в молодых клетках происходит накопление ионов калия и фосфатов за счет включения последних в молекулы АТФ и креатинфосфата. Напротив, по мере старения клеток, например эритроцитов в процессе хранения консервированной крови, происходит распад органических фосфатов с отщеплением и последующим выходом фосфатов, а также ионов калия в консервирующую среду. Иначе говоря, направление потока веществ изменяется на противоположное. Аналогичные явления выхода катионов калия в окружающую среду (вместо обычного их накопления) констатированы при воздействии обменных ядов, например цианидов, на ядерные эритроциты птиц или фторидов на безъядерные эритроциты млекопитающих. Подобные же факты имеют место и в мышцах при совершении ими механической работы и сопровождающем ее распаде аденозинтрифосфорной кислоты и креатинфосфата.

ПУТИ ПРОНИКНОВЕНИЯ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ

При всем разнообразии строения и физико-химических свойств молекул проникающих веществ существуют в основном два пути их проникновения в клетку: 1) через субмикроскопические заполненные водой поры, пронизывающие протоплазму и соединяющие ее с внешней средой; 2) за счет растворения в липидах, входящих в состав протоплазмы и, особенно, ее поверхностных слоев. Первый из указанных выше способов проникновения свойствен молекулам водорастворимых веществ, а также ионам. Второй способ свойствен водонерастворимым органическим соединениям.

Для диффузии молекул водорастворимых соединений, при условии, если их радиус не превышает радиуса гексоз, применимо уравнение Товерта

$$DM^{1/2} = \text{const}, \quad (5.3)$$

где D — константа диффузии,

M — молекулярный вес диффундирующего вещества.

Овертон (E. Overton) в 1895—1899 гг. установил зависимость проникающей способности веществ от их растворимости в липидах. Согласно сформулированным им эмпирическим правилам, проницаемость клеток для органических молекул уменьшается по мере возрастания количества гидроксильных, карбоксильных и аминогрупп. Напротив, введение в молекулу метиловых, этиловых и фениловых групп облегчает ее проникновение, хотя длина углеводородной цепочки, а, следовательно, размеры молекулы при этом возрастают.

Позднее Джекобс (M. Jacobs), исходя из современной теории электрического строения молекул, дал правилам Овертона рациональное объяснение. Он показал, что все химические соединения, а также отдельные, входящие в их состав радикалы, можно разбить на две большие группы:

1) электрически симметричные, т. е . те, у которых центры положительных и отрицательных зарядов совпадают друг с другом. Такие соединения носят название неполярных, или гомеополярных. К числу неполярных радикалов принадлежат метиловые, этиловые, фениловые группы;

2) электрически несимметричные — центры положительных и отрицательных зарядов которых не совпадают. Они получили название полярных или гетерополярных. Сюда относятся соединения с группами $COOH$, OH и NH_2.

Неполярные соединения хорошо растворимы в липидах, хлороформе и ацетоне имеют низкую диэлектрическую постоянную, а полярные хорошо растворимы в воде и характеризуются высокой диэлектрической постоянной.

Впоследствии Колландер и Берлунд показали наличие положительной корреляции между коэффициентами распределения

вещества в системе оливковое масло — вода (или лецитин — вода) и степенью его проникновения в клетки харовой водоросли (Chara fragilis). Для вычисления константы проницаемости была использована формула (5.2).

Перепишем формулу (5.2) следующим образом:

$$\frac{dm}{dt} = -ks\,(C - c), \tag{5.2а}$$

где C и c — соответственно начальная и конечная концентрации вещества в $г/см^3$.

Принимая $\frac{m}{c}$ равным v (v — объем клетки) и интегрируя, получаем:

$$k = \frac{v}{st}\ln\frac{C}{C - c}. \tag{5.2б}$$

Считая v и s постоянными в течение всего времени эксперимента, получим:

$$k = \frac{1}{t}\ln\frac{C}{C - c}. \tag{5.2в}$$

Пользуясь этим уравнением, авторы определили значения константы проницаемости более чем для 120 веществ. Результаты опытов подтвердили приведенное выше правило (рис. 45).

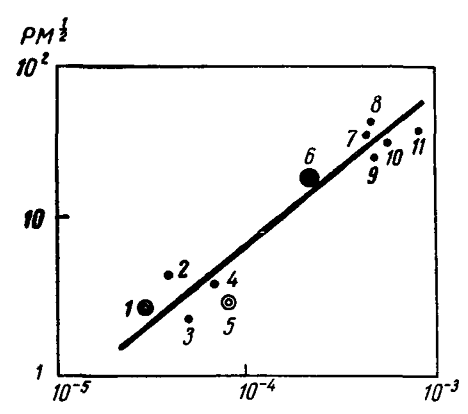


Рис. 45. Взаимоотношение проникающей способности ($PM^{1/2}$) и коэффициента распределения веществ в системе масло — вода:

1 — эритрит, *2* — метилтиомочевина, *3* — мочевина, *4* — глицерин, *5* — малонамид, *6* — уротропин, *7* — метилмочевина, *8* — дициандиамид, *9* — этиленгликоль, *10* — лактамид, *11* — ацетамид

Исключениями из общего правила являются мочевина и глюкоза, плохо растворимые в липидах, но легко проникающие в клетку, и хорошо растворимый в липидах, но плохо проникающий в клетку триметилцитрат. Весьма вероятно, что быстрое проникновение мочевины обусловлено ее способностью образовывать клещевидные соединения с белками, нарушая их структуру. Возможно также, что глюкоза нарушает глобулярную структуру некоторых белков; в частности, в ее присутствии коллоидно-осмотическое давление гемоглобина возрастает в четыре раза, что указывает на раскалывание молекулы гемоглобина, молекулярный вес которого равен 68 000, на четыре элементарных глобулы с молекулярным весом 17 000. Аномально высокая проницаемость клеток и тканей для глицерина

может быть, по-видимому, отнесена за счет его способности образовывать димеры, в которых маскирующие друг друга полярные гидроксильные группы соседних молекул более не препятствуют липоидорастворимости.

Все сказанное выше в большой степени связано с исследованием механизма наркоза. Наркотические вещества хорошо растворимы в липидах. Для оценки их действия это имеет большое значение. Еще в 1891 г. Майер (H. Meyer), а в 1899 г. Овертон показали, что наркотическое действие вещества тем больше, чем выше его растворимость в липоидах, или, точнее, чем выше его коэффициент распределения в модельной системе масло — вода. Отмеченными закономерностями можно, в частности, объяснить и мощное бактерицидное действие тимола, отличающегося очень высокой растворимостью в липоидах. Весьма вероятно, что и сильное фармакодинамическое действие углекислого газа, оказывающего летальное действие на млекопитающих, а в меньших концентрациях возбуждающего дыхательный центр высших животных и хеморецепторы насекомых, объясняется его исключительно высокой растворимостью в липоидах.

МЕМБРАННАЯ ТЕОРИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Исследования проницаемости клеток для неполярных соединений, в особенности для наркотиков, привели исследователей к построению так называемой липоидной теории клеточной мембраны. По этой теории наружная поверхность клетки покрыта одним (E. Gorter и F. Grendel) или двумя (H. Davson и J. F. Danielli) слоями молекул фосфолипидов. В последнем случае полярные группы фосфолипидов одного слоя обращены к воде, а соответственно второго слоя — во внутрь клетки (рис. 46).

Рис. 46. Структура клеточной мембраны (по Давсону и Даниелли): *А* — полярные концевые группы фосфолипидов; *Б* — гидрофобные «хвосты»; *В* — белок

Основываясь на измерениях емкостной составляющей суммарного сопротивления эритроцитов и полагая, что последняя определяется только поверхностными структурами, Фрикке вычислил толщину бимолекулярного слоя по формуле

$$C = \varepsilon \cdot \varepsilon_r \frac{s}{d}, \qquad (5.4)$$

где C — емкость клеток, найденная в опыте,
s — суммарная площадь поверхности клеток,

ε — диэлектрическая проницаемость оболочки, равная для липидов 2—3,

ε_r — пересчетный коэффициент, равный $8{,}84 \cdot 10^{-14}$ для случаев, когда емкость дана в фарадах, а размеры в сантиметрах,

d — искомая толщина оболочки.

Расчеты, произведенные на основании опытных данных, показали, что толщина клеточной мембраны приблизительно равна 32 Å, что соответствует бимолекулярному слою жирных кислот с длиной углеводородной цепочки в 16—17 углеродных атомов.

В дальнейшем было показано, что не одни только липиды участвуют в построении клеточной мембраны. На это указывают исследования физико-химических свойств клеточной поверхности и данные, показывающие, что в клетку могут проникать вещества, нерастворимые в липидах, — в первую очередь минеральные ионы и сахара.

Измерение величины поверхностного натяжения клеток, проведенное методом их расплющивания собственной силой тяжести и методом наложения внешнего давления, показало, что преодоление сил поверхностного натяжения и придача клетке формы эллипсоида совершаются в результате действия сил, уступающих на несколько порядков величине поверхностного натяжения капелек масла.

Аналогичные данные были получены методом микроскопического центрифугирования (т. е. при использовании центрифуги как вращающегося предметного столика микроскопа) со стробоскопической регистрацией. Это позволило вычислить величину поверхностного натяжения на основе экспериментальных данных, пользуясь для этого формулой

$$\sigma = \frac{2}{3} g r^c (d_2 - d_1) c, \qquad (5.5)$$

где σ — величина поверхностного натяжения,

g — ускорение силы тяжести,

r — радиус капли жирового включения,

d_1 — удельный вес капли,

d_2 — удельный вес среды, в которой она взвешена,

c — отношение центробежной силы к силе тяжести.

Найденные в опыте величины поверхностного натяжения составляют для яиц морского ежа Arbacia — 0,2 *дин/см*; для яиц полихеты Chetepterus — 0,33 *дин/см*, для яиц двустворчатого моллюска Cumingia — 0,54 *дин/см*.

Низкие величины поверхностного натяжения клеток указывают на наличие в их поверхности и веществ не жировой природы, в первую очередь белков.

Первоначально полагали, что локализация белков в клеточной мембране ограничена лишь их адсорбцией на полярных

группах фосфатидов (рис. 47). Однако использование методов поляризационно-оптического и рентгено-структурного анализа стром эритроцитов и миэлиновой оболочки нерва выявило более сложный характер пространственного расположения липоидов и белков.

Было найдено, что липиды размещаются радиально, а белки — тангенциально по отношению к поверхности клетки.

Тесный контакт липидов и белков в клеточной мембране и участие в ее построении сложных липопротеидных комплексов был постулирован на основании исследований, проведенных при помощи электронного микроскопа.

Представления о толщине мембраны разноречивы и отражают особенности методов, при помощи которых добыты те или иные данные. Так, по данным обычного поляризационно-оптического анализа толщина оболочки эритроцитов равна 100 Å, по определению запаздывания поляризованного луча — 400 Å, по лептоскопическим измерениям (отражение света от тонких слоев клеток высушенных и нанесенных на поверхность стекла) — 130 Å. В настоящее время считают, что толщина клеточной мембраны составляет приблизительно 75 Å.

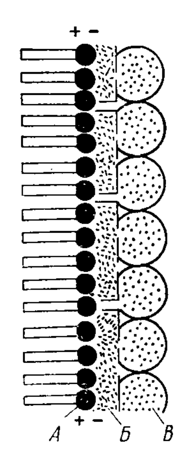


Рис. 47. Адсорбция глобулярных белков на белково-липоидной мембране: *А* — полярные группы фосфолипидов; *Б* — пленка несвернутых белков; *В* — глобулярный белок

ПРОНИКНОВЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

Участие белков в построении клеточной мембраны объясняет возможность проникновения в клетку молекул водорастворимых веществ — сахаров, аминокислот, и ионов минеральных солей. Однако эти вещества должны испытывать значительные затруднения при своем проникновении в клетку. Пересекая клеточную мембрану, они должны, во-первых, оторваться от окружающей их сольватной оболочки, во-вторых, раздвинуть плотно расположенные молекулы поверхностного слоя на границе клетка — омывающий ее раствор, в-третьих, преодолеть взаимодействие своих полярных групп с полярными группами, расположенными внутри канала поры, в-четвертых, преодолеть энергетический барьер на границе поверхностной мембраны и водного раствора коллоидов и ионно-дисперсных веществ, как сторонникам мембранной теории представляется протоплазма.

Таким образом, для того, чтобы молекула или ион водорастворимого вещества проникли в клетку, они должны обладать некоторым добавочным количеством энергии.

Число проникших в клетку водорастворимых молекул тем меньше, чем выше потенциальный барьер. Соответственно, тем медленнее происходит и само проникновение молекул в клетку.

Из химической кинетики известно, что чем больше энергия активации, тем выше температурный коэффициент химической реакции. По аналогии с вышесказанным остается предположить, что чем выше потенциальный барьер, тем выше и температурный коэффициент проникновения вещества в клетку.

Действительно, экспериментально найдено высокое значение температурного коэффициента для проникновения глюкозы, мочевины, глицерина, а также минеральных катионов — калия, натрия и лития. Однако высокое значение Q_{10} для проникновения перечисленных веществ может иметь и другое объяснение. Оно может быть следствием химических процессов, лежащих в основе взаимодействия проникающего вещества с теми или иными компонентами протоплазмы. Подобное взаимодействие имеет место не только по отношению к молекулам веществ, постоянно участвующих в клеточном метаболизме, но и к чужеродным соединениям.

Безусловно, слой протоплазмы имеет качественно иное строение и иные физико-химические свойства, нежели вся остальная масса протоплазмы. Однако из этого нельзя делать вывод, будто структура и свойства поверхностной мембраны являются единственными факторами, определяющими проникновение веществ в клетку.

ФАЗОВАЯ ТЕОРИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Анализируя факты, не умещающиеся в рамки мембранной теории, многие исследователи в СССР (Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, 1941; Д. Н. Насонов, 1959, А. С. Трошин, 1956) и за рубежом (M. Fischer, W. Suer, 1939; J. Segal) выдвинули новые представления о природе клеточной проницаемости. Согласно их взглядам, в основе проницаемости протоплазмы для растворенных веществ лежат различные формы сорбции (распределения) вещества между внешней средой и протоплазмой. Протоплазма при этом рассматривается как единая, несмешивающаяся с водой фаза. К различным формам сорбции, по Насонову, относятся: собственно распределение, основанное на различной растворимости вещества в водной среде и в протоплазме; адсорбция вещества на мицеллах белков и белково-липоидных комплексов, и, наконец, химическое связывание проникшего вещества с теми или иными компонентами протоплазмы. Распределение подчиняется закону Генри, согласно которому отношение концентраций вещества в двухфазной системе (в данном случае — клетка/среда) при наступлении термодинамического равновесия есть величина

постоянная т. е.

$$\frac{C_k}{C_s} = k, \tag{5.6}$$

где k — коэффициент распределения,

C_k — равновесная концентрация вещества в клетке,

C_s — соответственно, его концентрация в среде[1].

А. С. Трошин показал, что распределение веществ в соответствии с законом Генри наблюдается лишь при высоких его концентрациях в окружающей среде. При этом значение C_k оказывается ниже C_s и, соответственно, всегда $k < 1$.

Адсорбция вещества клеткой, описываемая кривой изотермы адсорбции, имеет место при низком содержании этого вещества в окружающей среде и приводит к накоплению его в клетке в концентрации, превосходящей таковую в среде.

Следует дополнительно указать, что помимо названных выше форм распределения, может иметь место и химическое связывание вещества. Оно выражается формулой $C_k = \text{const}$ и ему соответствует на графике прямая, параллельная оси абсцисс, отсекающая на оси ординат отрезок, равный величине C_k.

В том случае, когда предел адсорбции не достигнут, суммарное уравнение, выражающее зависимость концентрации вещества в клетке от его распределения и адсорбции, принимает нижеследующий вид:

$$C_k = C_s k + \frac{A_\infty}{C_s k + a}, \tag{5.7}$$

где A_∞ — предел адсорбционного насыщения,

a — тангенс наклона адсорбционной кривой, т. е. крутизна нарастания адсорбции.

При достижении же предела адсорбции формула (5.7) упрощается и приобретает нижеследующий вид:

$$C_k = C_s k + A_\infty. \tag{5.7a}$$

Основываясь на собственных экспериментальных исследованиях, проведенных на эритроцитах, мышечных волокнах и дрожжевых микроорганизмах, и на анализе данных, полученных другими авторами, А. С. Трошин показал справедливость выведенных им уравнений для случаев распределения целого ряда веществ (несбраживаемых сахаров, мочевины, креатина, аминокислот) между клетками и омывающими их водными растворами. Следует отметить, однако, что представления о протоплазме как о единой несмешивающейся с водой фазе носят приближенный характер. Прежде всего, протоплазма не является единой фазой, а сама

---

[1] Закон Генри графически представляют в виде прямой линии, берущей начало от начала координат. Тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс соответствует величине коэффициента распределения K.

по себе гетерогенна, точнее — микрогетерогенна, и включает, помимо липоидов, также и белково-липидные комплексы, белки и другие вещества. Электронно-оптические исследования выявили сложную субмикроскопическую структуру протоплазмы, ранее считавшейся оптически однородной. Кроме того, далеко не вся вода в протоплазме прочно связана. Напротив, количество прочно связанной воды, по данным Гилла (A. V. Hill, 1930 г.), составляет всего лишь 3—5% ее суммарного содержания. Поэтому нельзя считать, что вещества распределяются между окружающей клетку средой и протоплазмой точно так же, как между водой и неводной фазой.

Современные представления о наличии в протоплазме двух фаз — водной неупорядоченной и упорядоченной — структурированной, состоящей из линейно или пространственно расположенных макромолекул, хорошо согласуются с данными электронной микроскопии. Упорядоченной фазе при этом соответствуют ядро, митохондрии и другие органоиды клетки, а неупорядоченной фазе — гиалоплазма — коацерват с равновесной жидкостью.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ КИСЛОТ И ОСНОВАНИЙ

Хотя по своим размерам ионы меньше молекул, однако проникновение их в клетку в известной мере ограничено. Препятствием к проникновению ионов служит не столько их гидратация и наличие ионной атмосферы, увеличивающее их эффективный радиус, сколько взаимодействие заряда иона с зарядом поры, через которую ион проникает. Ионы водорода и гидроксила, несмотря на их относительно малый ионный радиус, практически вовсе не проникают в клетку не столько вследствие высокой степени гидрации, сколько в результате высокой реакционной способности и захвата концевыми химическими группами, локализованными на поверхности клетки. Сказанным объясняется непроницаемость нормальной неповрежденной клетки для сильных кислот и сильных оснований. Эти соединения могут проникнуть лишь в том случае, если поверхность клетки предварительно необратимо изменена в результате действия самих сильных кислот и оснований или вследствие влияния других повреждающих факторов, например ультрафиолетовых лучей. Так, в опытах С. С. Чахотина помещение яиц морского ежа, предварительно окрашенных витальным красителем — нейтральным красным, в морскую воду с добавкой к ней небольших количеств серной кислоты, не приводило к изменению окраски исследуемого объекта. Однако если на яйцеклетку направляли тонкий пучок ультрафиолетовых лучей, то в месте такого лучевого «микроукола» возникло резкое изменение окраски, свидетельствующее о проникновении серной кислоты в клетку. Таким образом, проникновение сильных кислот

является вторичным процессом, протекающим в предварительно поврежденной клетке.

В противоположность сильным кислотам и сильным основаниям, слабые кислоты и слабые основания легко проникают в клетку вследствие хорошей растворимости их недиссоциированных молекул в липоидах. Проникнув внутрь клетки, недиссоциированные молекулы слабых кислот и слабых оснований легко диссоциируют с образованием мало диффузибельных ионов. Последние уже с трудом выходят наружу, оказываясь как бы попавшими в ловушку. Вследствие этого в клетке и происходит накопление (аккумуляция) слабых электролитов — кислот и оснований.

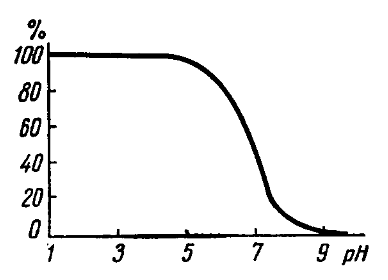


Рис. 48. Влияние активной реакции среды на проникновение в вакуоль *Valonia*:

по оси абсцисс — pH; по оси ординат — содержание H_2S в клетке (в%)

Приведенные закономерности могут объяснить, почему относительно слабые кислоты (т. е. имеющие низкую степень диссоциации), например уксусная, — вызывают ощущение кислого вкуса при таких концентрациях, при которых сильные кислоты подобного ощущения не вызывают. Легко проникая к хеморецепторам языка и затем диссоциируя, слабые кислоты вызывают их раздражение, тогда как сильные кислоты, обладающие низкой проникающей способностью, хеморецепторов и не достигают.

Произвольно изменяя активную реакцию внешней среды, можно увеличить или уменьшить количество недиссоциированных молекул и тем усилить или ослабить проникновение вещества в клетку (рис. 48). Так, смещая активную реакцию среды в кислую сторону, можно подавить диссоциацию слабых кислот, например сероводородной, и повысить степень ее накопления в вакуоли водорослей. Подкисляя растворы кислых красителей-хризоидина, уранина и других — можно повысить их проникновение. Подщелачивая растворы основных красителей (нейтрального красного, нильского голубого), удается значительно увеличить проникновение этих веществ и т. д.

Еще Овертон показал, что если поместить головастиков в воду, в которую добавлен азотнокислый стрихнин (до конечной концентрации, равной 0,01%), то животные ведут себя так же, как контрольные, находящиеся в простой воде. Однако если внести в воду, в которой находится стрихнин, небольшое количество питьевой соды, само по себе для головастиков совершенно безвредное, головастики тотчас погибают. Причина этого эффекта ясна: в присутствии соды стрихнин, как ион слабого органического основания, вытесняется на соединение с сильной минеральной

кислотой и в виде плохо диссоциирующего основания легко диффундирует через покровные ткани животного, вызывая его гибель.

Добавкой щелочей можно резко увеличить проницаемость кутикулы вредных насекомых для некоторых инсектицидов, например анабазина, или усилить проникновение таких лекарственных веществ, как атропин и пилокарпин, в слизистые оболочки глаза.

Исходя из вышеизложенного, легко объяснить, почему добавление к раствору солей слабых оснований и сильных кислот подщелачивает внутриклеточное содержание, а добавление солей сильных оснований и слабых кислот, напротив, его подкисляет. Так, хлорид аммония, раствор которого имеет кислую реакцию, подвергается спонтанному гидролизу и дает начало образованию аммиака. Последний беспрепятственно проникает в клетку и растворяясь в ее водной фазе, приводит к появлению едкого основания аммония, диссоциирующего на ионы NH_4^+ и OH^-. Указанные ионы с трудом выходят из клетки и, оставаясь в ней как в ловушке, сообщают внутриклеточной среде щелочную реакцию.

Подобно описанному, бикарбонат натрия, водный раствор которого характеризуется основной реакцией, гидролизуется, образуя слабо диссоциирующую угольную кислоту. Последняя, проникнув в клетку, диссоциирует на ионы H^+ и HCO_3^- и смещает внутриклеточную активную реакцию в кислую сторону.

Все приведенные здесь примеры указывают на наличие одностороннего направленного движения слабых кислот и слабых оснований из внешней среды внутрь клетки. В основе этого явления, согласно Д. Л. Рубинштейну, лежит различие в численном значении физико-химических параметров среды и клетки и соответственное изменение физико-химического состояния проникающих частиц, например пребывание их в виде недиссоциированных диффузибельных молекул во внешней среде и в форме малодиффузибельных ионов в клетке.

Односторонняя проницаемость может иметь место и в условиях различия величин окислительно-восстановительного потенциала для веществ, легко переходящих из восстановленной более диффузибельной формы в более адсорбируемую окисленную форму.

Логически развивая эту мысль, Рубинштейн пришел к выводу о ведущей роли различий интенсивности метаболических процессов в обеспечении направленного движения веществ в клетку. Протекающие в клетках процессы фосфорилирования и дефосфорилирования, аминирования и дезаминирования, окисления сульфидных групп и восстановления дисульфидов могут обеспечить различные состояния молекул по обе стороны клеточной поверхности и этим создать условия для осуществления и поддержания направленного движения веществ из внешней среды в клетку.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КАТИОНОВ МЕЖДУ КЛЕТКОЙ И СРЕДОЙ

Проницаемость протоплазмы для катионов. Вопрос о проницаемости клеток для катионов в течение длительного времени продолжает быть предметом оживленных дискуссий.

Уже в конце прошлого столетия Абдергальден (E. Abderhalden) установил различие минерального состава эритроцитов и плазмы в крови млекопитающих, а именно — резкое преобладание ионов натрия в плазме и преобладание ионов калия в эритроцитах (исключение из этого правила составили только богатые ионами натрия эритроциты собаки и кошки). Аналогичные данные были впоследствии получены на ядерных эритроцитах птиц и рептилий, а также на мышечных волокнах и на нервных клетках.

Исходя из приведенных данных, а также из осмометрических исследований проницаемости эритроцитов для минеральных солей, первоначально был сделан вывод о полной непроницаемости клеток для катионов калия и натрия. При этом предполагалось, что в период созревания эритробласты и ретикулоциты в состоянии каким-то образом накапливать ионы калия против концентрационного градиента, после чего клеточная мембрана вообще становится непроницаемой для этого катиона. Для ионов натрия, по этой гипотезе, клеточная мембрана в норме считалась вообще непроницаемой.

Однако появившийся в последние десятилетия экспериментальный материал опровергает подобные представления. Во-первых, были установлены суточные колебания количества калия в эритроцитах и, соответственно, в плазме крови человека, что указывало на проницаемость эритроцитов для этого катиона. Во-вторых, было показано, что при инкубации крови человека при 37° С в присутствии глюкозы после предварительного хранения в холодильнике при +3— +5° С эритроциты накапливают ранее утраченные ими на холоду ионы калия. Иначе говоря, в этих условиях эритроциты накапливают ионы калия. В-третьих, методом меченых атомов было обнаружено, что ионы калия, содержащиеся в эритроцитах, постоянно обмениваются на ионы калия плазмы в строго эквивалентных количествах.

Параллельно, методом радиоактивных изотопов было выявлено, что содержащиеся в эритроцитах человека в небольших количествах ионы натрия обмениваются на ионы натрия, находящиеся в плазме.

Необходимо было объяснить, каким образом при наличии экспериментально доказанной проницаемости клеток как для калия, так и для натрия имеет место стойкое сохранение различия катионного состава клеток и омывающей их тканевой жидкости. Выяснение этого вопроса с позиций мембранной теории встретило серьезные затруднения.

Если накопление иона K^+ пытались связать с удержанием калия отрицательными зарядами концевых карбоксильных групп белковых цепочек, то низкую концентрацию иона натрия в подавляющем большинстве клеток объяснить оказалось значительно труднее. С этой целью Дин (Dean), Ходжкин и другие выдвинули так называемую теорию метаболического натриевого насоса. По этой теории, натрий непрерывно откачивается из клетки, т. е. движется против концентрационного градиента, за счет образования с одним из компонентов клеточной мембраны соединения, плохо диссоциирующего и поэтому хорошо растворимого в липидах. Синтез такого соединения осуществляется, по мнению сторонников теории насоса, ферментативным путем и требует затраты энергии, поставляемой дыхательными процессами или гликолизом, или распадом макроэргических связей. После прохождения через мембрану плохо диссоциирующий (а потому легко проникающий) комплекс распадается (опять-таки ферментативным путем), в результате чего освободившийся ион натрия оказывается выведенным за пределы клетки.

Теория насоса встречает серьезные возражения. Прежде всего до настоящего времени с достоверностью не обнаружены соединения, способные избирательно связывать натрий предпочтительно перед калием. Кроме того, как показали расчеты, перенос натрия против концентрационного градиента требует больших энергетических затрат, чем те, которые покрываются за счет процессов клеточного дыхания. Следует также указать, что объяснение движения любых веществ против концентрационного градиента подобным способом означает признание наличия в поверхности клетки бесчисленного множества специфических веществ (и соответствующих им ферментативных систем), каждое из которых обладает избирательным средством к переносимому им субстрату.

Аналогичные схемы были выдвинуты и для объяснения переноса калия из тканевой жидкости или плазмы крови в клетку, т. е. для переноса, происходящего будто бы против концентрационного градиента.

В действительности, однако, неодинаковый катионный состав клеток и тканевых жидкостей получает совершенно иное объяснение, если учесть различие физико-химического состояния ионов внутри клетки и вне ее, если принять во внимание, что значительная часть катионов в протоплазме не свободна, а каким-то образом связана. В пользу подобного допущения свидетельствует, во-первых, явление анионного дефицита, т. е. значительно меньшего количества внутриклеточных анионов по сравнению с катионами. Явление анионного дефицита не следует понимать в буквальном смысле. Речь идет только о дефиците минеральных анионов, покрывающимся за счет отрицательных фиксированных зарядов концевых карбоксильных групп полипептидных белковых цепочек.

Во-вторых, помещение клеток в растворы, не содержащие электролиты (например, в изотонический раствор сахарозы), не приводит к диффузионному выравниванию концентрации катионов между клетками и средой; часть катионов калия клеткой стойко удерживается.

В-третьих, количество проникшего калия в клетку не находится в линейной зависимости от его концентрации в наружном растворе. При увеличении его содержания в растворе выше известного предела количество калия более не возрастает. По-видимому, протоплазма обладает ограниченной способностью связывать калий и, по мере насыщения групп, ответственных за его связывание, становится для этого катиона как бы непроницаемой.

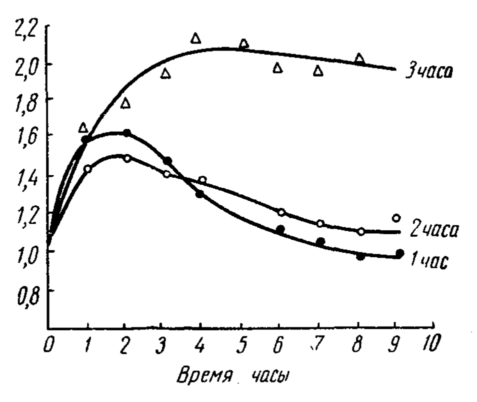


Рис. 49. Кинетика выхода меченого калия из эритроцитов в плазму:
по оси абсцисс — время в часах, по оси ординат — активность K^+ в *мэкв/л* в час. На графике указано время предварительной инкубации

Наконец, важнейшим аргументом в пользу связывания части катионов высокомолекулярными компонентами протоплазмы явились опыты, проведенные методом радиоактивных изотопов. Как показали в 1955 г. Соломон и Голд (A. Solomon и G. Gold), кинетика выхода радиоактивного калия из эритроцитов человека, предварительно меченных по этому иону, не подчиняется монотонной экспоненциальной кривой, соответствующей закону Фика. Напротив, в течение первых 2—3-х часов калий выходит из эритроцитов, причем его активность в плазме оказывается даже выше, чем в эритроцитах. Вслед за этим активность калия в суспензионной среде начинает постепенно падать за счет его поступления в клетки и достигает конечного значения спустя 12—14 часов (рис. 49). Математический анализ результатов опыта привел авторов к выводу о наличии в клетке по крайней мере двух фаз, в одной из которых находится связанный, а в другой — свободный калий. В то время как ионы свободного калия, содержащиеся в водной фазе эритроцитов, обмениваются на ионы калия, находящиеся в плазме крови на основе закона обменной диффузии связанный калий обменивается на калий дисперсионной среды (а также на калий водной фазы клеток), в соответствии с законами изотопного обмена. Как показали произведенные расчеты, концентрации калия в водной фазе эритроцитов и, соответственно, в плазме численно почти равны друг другу (2,35 *мэкв/л*), тогда

как концентрация связанного калия составляет величину порядка 44,1 *мэкв/л* (рис. 50).

Аналогичные закономерности были установлены и по отношению к иону натрия.

Причина удержания в клетках иона калия еще не установлена. Существует предположение, что величина ионного радиуса калия соответствует толщине слоя так называемой «структурированной воды», расположенного вокруг белковых молекул. Поэтому ион калия как бы вписывается в водно-белковую структуру и остается в ней. Напротив, радиус иона натрия превышает толщину слоя структурированной воды, вследствие чего этот ион разрывает структурированный слой и поэтому в протоплазме не удерживается (A. Szent — Györgyi).

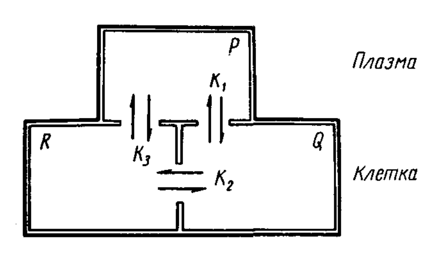


Рис. 50. Схема распределения меченых ионов калия между эритроцитами и плазмой: P — плазма; Q — «упорядоченная» фаза эритроцита; R — водная фаза эритроцита; K_1 — поток K^+ в *мэкв/л* в час между P и Q; K_2 — то же между Q и R; K — то же между Q и P

Согласно другой гипотезе, которую выдвинул Линг (G. Ling), предпочтительное содержание калия в клетках обусловлено более низким значением диэлектрической постоянной его гидратной оболочки и, соответственно, более высоким значением его электростатического потенциала, чем у натрия. Вследствие указанных причин калий сильнее, чем натрий, притягивается к отрицательно заряженным группам —«фиксированным зарядам» полиэлектролитов.

Правильность подобных представлений о конкурентных взаимоотношениях калия и натрия подтверждается специальными опытами, в которых мышцы крыс, вскармливаемых пищей, лишенной калия, накапливали натрий. При переводе части опытных животных на диету, содержащую калий, ионный состав мышц возвращается к норме.

В свете всех приведенных данных становится понятным участие обмена веществ в накоплении калия протоплазмой клеток: энергия, освобождаемая в процессах дыхания или брожения, используется на синтез высокомолекулярной «упорядоченной» фазы, как полиэлектролитной системы. Фиксированные заряды последней и удерживают калий внутри клетки.

Таким образом, самое представление о протоплазме как о полиэлектролитной системе избавляет нас как от формальных построений классической мембранной теории и теории активного транспорта, так и от практических затруднений, испытываемых так называемой фазовой теорией. С позиций фазовой теории, считающей, что весь калий в клетке находится в связанном состоянии,

трудно объяснить наличие осмотического давления растворов электролитов внутри клетки. Представление о протоплазме как о полиэлектролитной системе снимает это затруднение. Если часть ионов свободна, но ограниченна в своем движении полями фиксированных зарядов, становится понятным, почему катионы удерживаются в клетке, несмотря на то, что термодинамическая активность отличается от таковой в тканевых жидкостях не более чем на 15—20%.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ ВОДЫ. ПЕРЕНОС ВОДЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Проницаемость клеток для молекул воды весьма велика.

Проникновение воды в клетки ткани может осуществляться: 1) по осмотическому градиенту за счет диффузии и разности осмотического или коллоидо-осмотического давления, 2) в направлении, противоположном осмотическому градиенту за счет разности гидростатического давления (путем ультрафильтрации) или за счет наличия электрического градиента — электроосмоса.

Движение воды путем диффузии описывается уже приведенным выше уравнением Фикка (5.1). Скорость диффузии воды измеряется в условиях равенства величин осмотического давления клетки и омывающего ее раствора. Для измерения константы проницаемости при диффузии (*P* диффузионная) пользуются тяжелой водой, меченной либо по водороду дейтерием (DHO, D_2O), либо по кислороду тяжелым кислородом (H_2O^{18}). В последнее время для тех же целей применяют воду, меченную тритием. Константу диффузионной проницаемости вычисляют, исходя из того, что скорость самодиффузии прямо пропорциональна площади пор, т. е. в конечном счете — квадрату радиуса пор.

Кроме диффузии, пассивный перенос воды может осуществляться путем фильтрации, т. е. за счет разности осмотических давлений по обе стороны пористой мембраны. В случае фильтрации скорость переноса воды определяется по приросту веса (или объема) клетки. Весовые измерения требуют весьма совершенной и прецизионной аппаратуры, например микровесов Линдерстрема.

Константа фильтрации, точнее, константа фильтрационной проницаемости (сокращенно $P_ф$), в отличие от константы диффузионной проницаемости ($P_д$) пропорциональна четвертой степени радиуса пор в соответствии с законом Пуазейля, описывающим капиллярное истечение жидкости под давлением:

$$\frac{dv}{dt} = \frac{\pi r^4}{8\eta l}\frac{dp}{dx}, \qquad (5.8)$$

где v — объем воды в *см*^{3},
t — время в *сек*,

r — радиус в *см*,

η — вязкость в сантипуазах,

l — длина капилляра в *см*,

p — давление в *дин/см²*,

x — расстояние в *см*.

Специальные расчеты Ренкина и Паппенгеймера (Renkin и Pappenheuner, 1957) показали одинаковую эффективность диффузии и фильтрации при условии, если радиус пор не превышает 5 Å ($5 \cdot 10^{-8}$ *см*). При больших размерах пор фильтрация (т. е. гидродинамическое истечение по Пуазейлю) преобладает над диффузией, при меньших, напротив, диффузия превалирует над фильтрацией.

Таким образом, проводя на одном и том же объекте определение диффузионной проницаемости методом меченых атомов и фильтрационной проницаемости весовым или объемным методом, можно составить представление об участии различных механизмов в суммарном переносе воды через поверхность клетки и через ткани. Так, на икре травяной лягушки и рыб было показано, что созревание не влияет на величину диффузионной проницаемости, а величина осмотической (фильтрационной) проницаемости при этом уменьшается более чем в 25 раз. Таким образом, величина $P_ф$ для овариальных яиц во много раз превосходит значение $P_д$, а для абдоминальных яиц отношение $P_ф/P_д$ близко к единице. Это показывает, что в момент откладывания яиц происходит существенное изменение структуры их оболочек: пористость оболочек резко уменьшается. Весьма вероятно, что уменьшение пористости яйцевой оболочки при созревании яйца служит приспособлением, обеспечивающим сохранение постоянства объема клетки при попадании ее в гипотоническую среду — пресную воду.

В качестве другого примера соотношения диффузионной и фильтрационной проницаемости можно привести движение воды через кожу лягушки при впрыскивании животному гормона задней доли гипофиза. В этом случае имела место нак называемая реакция Брюнна, т. е. увеличение веса лягушки за счет проникновения в ее тело воды из внешней среды.

До введения гормона диффузионная проницаемость кожи лягушки составляет 356 *мкл/см²/ч*, а фильтрационная проницаемость равна всего лишь 9,2 *мкл/см²/сек*. После инъекции питуитрина диффузионная проницаемость увеличивается крайне незначительно, всего лишь на 12—13%, а фильтрационная проницаемость возрастает более чем в два раза.

Таким образом, в основе действия питуитрина на проницаемость кожи лягушки лежит вызванное им увеличение диаметра кожных пор.

РОЛЬ КОЛЛОИДНО-ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ В ПЕРЕНОСЕ ВОДЫ

В норме перепад осмотического давления между клетками и тканевыми жидкостями невелик. Кроме того, такие гистогематические барьеры, как капиллярный эндотелий, практически полностью проницаем для низкомолекулярных веществ. Поэтому нельзя ожидать, чтобы осмотическое давление тканевых жидкостей, а также крови или гемолимфы, создаваемое ионами минеральных солей и другими низкомолекулярными компонентами, играло существенную роль в осмотическом переносе воды из тканевых жидкостей и соединительной ткани в кровь.

Основное значение в переносе воды из лимфы и соединительной ткани в плазму крови принадлежит коллоидам плазмы, несмотря на их крайне низкое, вследствие плохой растворимости, содержание в плазме (всего порядка 7%). Величина осмотического давления, создаваемого коллоидами плазмы (так называемое коллоидно-осмотического давления) также, соответственно, крайне незначительна и равна давлению водяного столба высотой 40 *см*. В то же время осмотическое давление крови человека и высших животных измеряется 7,5—8 атмосферами.

Величина осмотического давления крови в двести с лишним раз превосходит величину коллоидно-осмотического давления, создаваемого белками плазмы. Несмотря на это коллоидно-осмотическому давлению крови принадлежит важная роль в поступлении воды в кровяное русло. В этом можно было убедиться на опыте хирургической клиники. Как показал еще Старлинг (E. Starling), а позднее Бейлис (W. Bayliss), переливание физиологического раствора после острой кровопотери вызывает у реципиента картину отека, т. е. набухания соединительной ткани и одновременно приводит к резкому увеличению объема эритроцитов. Добавление к физиологическому раствору гуммиарабика (до концентрации, равной 7%) полностью устраняло описанные осложнения. В настоящее время в клинике используют цельную кровь, а результаты опытов Бейлиса сохраняют свое значение при создании изоколлоидных растворов.

Одновременно с коллоидно-осмотическим градиентом между кровью и лимфой существует градиент гидростатического давления, обусловленный работой сердца. В соответствии с градиентом коллоидно-осмотического давления вода поступает из лимфы в кровь, а гидростатическое давление вызывает движение воды в противоположном направлении, т. е. из крови в лимфу.

Взаимное уравновешивание гидростатического и коллоидно-осмотического градиентов при их взаимном наложении друг на друга имеет место только в центральных участках капилляров. У артериального участка капилляров гидростатическое давление превалирует над коллоидно-осмотическим. Соответственно и вода

устремляется из кровяного русла в лимфу и соединительную ткань. Напротив, в венозных участках капилляров гидростатическое давление оказывается не только меньше, чем в артериальном их конце, но и уступает по величине коллоидно-осмотическому давлению. Вследствие этого вода из соединительной ткани и лимфы движется в плазму крови. Таким образом, в центральных участках капилляра коллоидно-осмотическое и гидростатическое давление

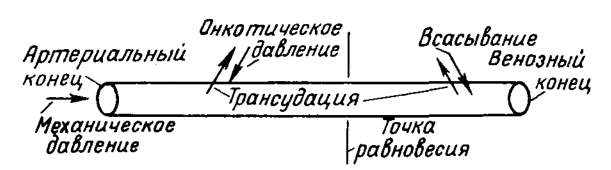


Рис. 51. Схема водного обмена между плазмой крови и лимфой

взаимно компенсируют друг друга, что с точки зрения термодинамики соответствует стационарному состоянию, характерному для нормального здорового организма (рис. 51).

При ряде патологических процессов стационарное состояние нарушается. Нарушения могут быть следствием либо повышения гидростатического давления крови, либо снижения суммарного количества белков крови, и, соответственно, падения коллоидно-осмотического давления. Повышение гидростатического давления крови, в частности, имеет место при тяжелых гипертонических состояниях. Падение коллоидно-осмотического давления плазмы крови наблюдается при острых кровопотерях, при шоковых состояниях и ожогах, а также при острой лучевой болезни. В последнем случае происходит сильное увеличение проницаемости капилляров, стенки которых, вследствие наступающей при облучении деполимеризации мукополисахаридов, пропускают высокомолекулярные вещества из кровяного русла и межтканевые пространства. Резкие нарушения водного обмена приводят в конечном счете к явлениям отека. В его основе может лежать не только повышение гидростатического или понижение коллоидно-осмотического давления крови, но и изменение гидрофильности соединительной ткани, в частности возникающее при нарушении щелочно-кислотного равновесия.

Если суммарная величина осмотического давления крови человека и высших животных поддерживается на постоянном уровне благодаря тонкой регуляции со стороны центральной нервной системы, то осмотическое давление тканей может значительно изменяться при функциональных сдвигах. Так, при активной мышечной работе, сопровождающейся распадом углеводов и ионно-белковых комплексов, количество осмотических активных молекул возрастает, а потому и увеличивается осмотическое давление.

Еще более значительное увеличение осмотического давления наблюдается в тканях при патологических явлениях, в частности, при воспалении в результате интенсивно идущих процессов гликолиза и протеолиза и освобождения ионов калия из их связи с белками. Образование большого количества молекул и ионов при одновременном повышении температуры за счет экзотермического характера протекающих в воспалительном очаге реакций приводит к резкому возрастанию осмотического давления, как это становится ясным из рассмотрения формулы:

$$P = CRT, \qquad (5.9)$$

где C — концентрация вещества (количество осмотических активных молекул),
R — газовая постоянная,
T — температура в градусах абсолютной шкалы.

Движение воды против осмотического градиента совершается за счет затрат энергии, освобождаемой в процессе метаболизма, и требует для своего осуществления производства определенной работы. *Работа, которую нужно произвести для поддержания разности осмотического давления (осмотического градиента) между тканевыми жидкостями организма и его внешней средой и для переноса воды против осмотического градиента, называется осмотической работой.*

Величину осмотической работы вычисляют по формуле, которой в термодинамике описывают работу при обратимом изотермическом процессе:

$$\Delta F = A = RT \ln \frac{C_1}{C_2}, \qquad (5.10)$$

где ΔF — изменение свободной энергии,
A — работа,
R — газовая постоянная,
T — абсолютная температура,
C_1 и C_2 — соответственно, осмотическое давление крови и секрета, например мочи.

Пользуясь формулой, можно вычислить энергию, затрачиваемую почками при выполнении ими осмотической работы.

Осморегуляторный аппарат впервые появляется в филогенезе у пресноводных простейших, а именно у ресничных инфузорий, где он имеет форму сократительной вакуоли. Последняя, выделяя гипотонический секрет, поддерживает разность осмотического давления между внутриклеточным содержимым и пресной водой, тем самым препятствуя набуханию клеточного тела. У немногих видов простейших, обитающих в морской воде, сократительная вакуоль выделяет гипертонический секрет. Существенно отметить, что при переносе морских видов в пресную воду происходит перестройка работы вакуоли, выделяющей в этих условиях гипотонический секрет взамен гипертонического. При этом сама

вакуоль приобретает строение, характерное для этого органоида у пресноводных форм.

В основе работы сократительной вакуоли, по современным данным, лежит сокращение и расслабление контрактильных белков, входящих в состав стенки вакуоли. Зависимость работы вакуоли от метаболитов, как источников свободной энергии, и подавление секреторной деятельности обменными ядами делает эту гипотезу Гольдакра весьма правомочной.

У пресноводных ракообразных функцию осморегуляторного органа выполняет антеннальная железа, выделяющая гипотонический секрет и отсутствующая у обитателей морской воды — лангусты и омара.

У пресноводных и морских рыб осмотическую работу выполняют жабры, выделяющие у первых гипотонический, а у вторых — гипертонический секрет. У проходных рыб (лосось, угорь) осмотическая работа жабр осуществляется как за счет выделения гипотонического (по отношению к крови) секрета, так и путем выделения гипертонического секрета в зависимости от того, находятся ли рыбы в пресной или, соответственно, в морской воде.

Осмотическое давление крови рыб занимает по своей величине среднее положение между осмотическим давлением морской и пресной воды. Кажущееся исключение из этого общего правила составляют акуловые рыбы, у которых осмотическое давление крови равно по величине осмотическому давлению их среды обитания. Однако осмотическое давление крови акуловых лишь наполовину обеспечивается наличием в ней электролитов и, прежде всего, хлорида натрия,— кроме электролитов, в поддержании осмотического давления основное участие принимает мочевина. Для последней покровные ткани акуловых, в отличие от клеток и тканей их внутренних органов, вовсе непроницаемы. Поэтому мочевине и принадлежит роль осмотически активного вещества.

В противоположность жабрам, почки у рыб выполняют осмотическую работу только у пресноводных видов, у которых моча, по сравнению с кровью, гипотонична. У морских же форм моча изотонична крови, и почки, таким образом, выполняют лишь функцию экскреторного органа.

У наземных животных в отличие от рыб осмотическую работу выполняют почки.

Почки высших животных и человека в зависимости от содержания воды в их пищевом рационе выделяют либо гипотоническую, либо гипертоническую мочу. Гипотоническая (по отношению к крови) моча выделяется после принятия жидкой пищи, а гипертоническая, напротив, при сухоядении. Таким образом, и в первом и во втором случае осмотическое давление мочи сильно отличается от осмотического давления крови.

Подобное различие имеет, однако, место только у здоровых людей. У больных нефритом заметных отличий осмотического

давления крови и мочи как при большом количестве воды в пище, так и при сухой диете не наблюдается. Иначе говоря, при болезнях почек последние в большей или меньшей мере утрачивают способность производить осмотическую работу.

АНОМАЛЬНЫЙ ОСМОС

К объяснению элементарных процессов, лежащих в основе осмотической работы жабр и почек, были привлечены различные механизмы. Среди них особое внимание было уделено так называемому аномальному осмосу, являющемуся частным случаем явления электроосмоса, которое открыл в 1807 г. русский химик Ф. Рейсс (см. гл. 9). Явление аномального осмоса, которое подробно изучили Ж. Лёб, Фрейндлих, а также в последние годы Соллнер, предусматривает движение жидкости через поры мембраны, отделяющие друг от друга растворы электролитов разной концентрации. Такое движение происходит либо с дополнительным ускорением или замедлением, но по осмотическому градиенту (так называемый положительный аномальный осмос) либо против осмотического градиента, только по электрическому градиенту (так называемый отрицательный аномальный осмос).

В процессе аномального осмоса одновременно участвуют два фактора. Первый из них — разность потенциалов, возникающая между двумя растворами, которые контактируют друг с другом через поры мембраны. Второй фактор — электрокинетический потенциал, т. е. разность потенциалов между фиксированным на стенках пор слоем жидкости и подвижным слоем последней.

Величина и знак разности потенциалов могут быть различными в зависимости от концентрации электролитов и от их природы, в особенности от соотношения подвижности катиона и аниона в растворе, а также от знака зарядов стенок пор, плотности заряда и диаметра пор.

Величина электрокинетического потенциала зависит от химической природы пористого материала и от способности ионов адсорбироваться на стенках пор. Так, катионы сильнее адсорбируются отрицательно заряженными группами, нежели, соответственно, положительно заряженными. Для анионов имеют место обратные отношения. Что касается многовалентных ионов, то они адсорбируются в большей степени, чем одновалентные.

В результате адсорбции ионов на стенках каналов пор образуется двойной электрический слой. Один слой располагается на поверхности подвижного потока жидкости, а второй слой фиксирован стенками канала пор.

Благодаря наличию разности потенциалов, между расположенными по обе стороны перегородки растворами, происходит

либо ускоренное движение жидкости по осмотическому градиенту, либо движение против осмотического градиента.

Для того, чтобы происходил электроосмос, необходимо непрерывное течение электрического тока в системе, так как электроосмос возможен только при наличии замкнутой цепи. Но если все поры в перегородке будут одинаковыми в отношении своей электрической характеристики (например, если их диаметр одинаковый), то, естественно, тока не будет. Если же размеры пор неодинаковы, тогда и потенциалы также будут различными по своей величине и в результате возникнут электрические токи небольшой силы, которые будут циркулировать между близлежащими порами. Если одна из пор имеет более высокую разность потенциалов, нежели соседняя, то произойдет электроосмотическое смещение жидкости из одной поры в другую. При этом направление смещения в каждом отдельном случае определяется знаком заряда свободной поверхности потока жидкости.

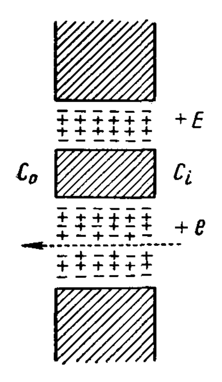


Рис. 52. Положительный аномальный осмос.
Объяснение см. в тексте

Разберем несколько примеров аномального осмоса.

Пусть пористая мембрана отделяет друг от друга растворы соляной кислоты, имеющие различную концентрацию, соответственно, C_0 и C_1, причем C_0 больше C_1. Стенки пор заряжены отрицательно, поры имеют различный диаметр. Тогда узкая пора окажется проницаемой только для положительно заряженного иона, т. е. в данном случае для обладающего высокой подвижностью иона водорода. Соответственно и потенциал поры (E) будет положительным и бо́льшим по величине. Более широкая пора проницаема и для катионов и для анионов; ее потенциал (e) также имеет положительный знак, но по величине меньше, чем потенциал узкой поры (E). Положительный потенциал оттолкнет положительно заряженный с поверхности поток жидкости в направлении от C_i к C_0. В результате жидкость будет двигаться в направлении осмотического градиента. Наблюдается положительный аномальный осмос (рис. 52).

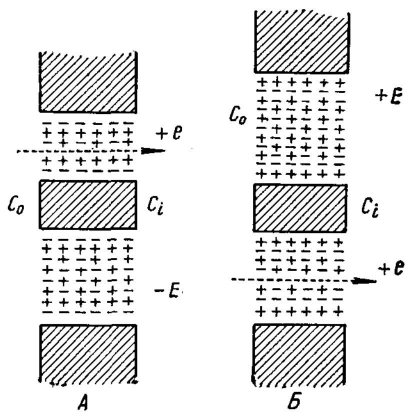


Рис. 53. Отрицательный аномальный осмос.
Объяснение см. в тексте

Разберем один из примеров отрицательного аномального осмоса.

Пусть по обе стороны мембраны с отрицательно заряженными стенками пор находятся растворы хлористого лития различной концентрации C_0 и C_i, причем $C_0 > C_i$. Диффузия раствора соли идет, таким образом, в направлении от C_0 к C_i. Так как подвижность лития мала по сравнению с таковой для хлора, то в более широкой поре установится большой отрицательный потенциал. В узкой же поре, через которую проходит только положительный ион лития, потенциал окажется положительным, но в силу малой подвижности Li — небольшим по величине. Поэтому-то более высокий отрицательный потенциал широкой поры обусловит движение положительно заряженного потока жидкости в направлении, противоположном осмотическому градиенту (рис. 53, *А*).

Приведем еще один пример отрицательного аномального осмоса. Пусть в этом примере стенки пор мембраны заряжены положительно, причем хотя в мембране имеются как узкие, так и широкие поры, однако и те и другие достаточно широки, чтобы пропускать не только анионы, но и катионы. По условию, мембрана отделяет друг от друга растворы соляной кислоты различной концентрации C_0 и C_i, причем $C_0 > C_i$. В этом случае, как нетрудно понять, в более широкой поре возникает небольшой, а в более узкой — большой положительный потенциал. В итоге, отрицательно заряженный с поверхности поток жидкости направится в сторону, противоположную осмотическому градиенту (рис. 54, *Б*).

Приведенная выше картина отрицательного аномального осмоса была с успехом использована для анализа движения воды через изолированную кожу лягушки, натянутую между двумя растворами Рингера, отличающимися друг от друга по величине давления на 2—4 *см* водяного столба. В указанном примере имеет место классический отрицательный аномальный осмос в направлении от эпителия к соединительной ткани.

ГЛАВА VI

ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Данная глава посвящена вопросу проведения электрического тока живыми объектами, т. е. вопросу о так называемых пассивных электрических явлениях в живых системах.

Измерение электропроводности используется в биологии, во-первых, для характеристики физических свойств живого вещества; во-вторых, для изучения изменений, связанных с функциональным состоянием. Эти работы основаны на том, что электропроводность биологического объекта в данных условиях — величина весьма постоянная. Кроме того, данные, полученные при изучении электропроводности биосубстрата, позволяют судить о его структуре. Последнее особенно важно для биофизики. Метод электропроводности позволяет изучать структуру живого вещества, не повреждая ее.

Указанный метод широко начали использовать при работе с биологическими объектами, примерно, с середины XIX века.

Исследование этим методом физико-химической структуры клеток и тканей началось с работ Гебера (R. Höber), который измерял электропроводность крови, мышц, и продолжено работами Остергаута (W. Osterhout), проведенными на коже лягушки и на клетках водорослей. В последних работах методом электропроводности регистрировались изменения, наблюдаемые в живых тканях при нарушении физиологических процессов.

Уже в ранних работах было отмечено несоответствие между большим содержанием электролитов в клетках живых организмов и низкими величинами электропроводности биологических объектов.

Как известно, электропроводность — величина, обратная сопротивлению проводника:

$$L=\frac{1}{R}. \qquad (6.1)$$

Сопротивление выражается формулой:

$$R=\rho\frac{l}{S}, \qquad (6.2)$$

где ρ — удельное сопротивление,
l — длина проводника,
S — сечение проводника.

Для выражения электропроводности формула будет иметь следующий вид:

$$L = \frac{1}{\rho} \cdot \frac{S}{l}, \qquad (6.3)$$

где $\frac{1}{\rho}$ — удельная электропроводность, обозначаемая буквой $\varkappa$. Размерности удельной электропроводности — обратный омосантиметр, так как

$$\varkappa = L\frac{l}{S}\ \text{ом}^{-1}\ \frac{\text{см}}{\text{см}^2} = L\frac{l}{S}\ \text{ом}^{-1}\text{см}^{-1}.$$

При работе с биологическими объектами обычно определяют сопротивление.

Измерение удельного сопротивления различных растительных и животных клеток и тканей показало, что для постоянного тока оно измеряется величинами порядка 10^6—10^7 омосантиметров. Это означает, что живые клетки должны быть отнесены к группе полупроводников [1].

Есть все основания считать, что полученные величины были несколько занижены. Дело в том, что измерение абсолютной величины сопротивления живых объектов является очень трудной задачей. Биологические объекты неоднородны. На поверхности отдельных клеток всегда есть проводящий слой жидкости, который нельзя удалить; в результате этого имеют место трудно учитываемые утечки тока.

При работе с тканями значительная часть постоянного тока проходит по заполняющей межклетники жидкости, электропроводность которой относительно высока. Кроме того, сечение межклеточных промежутков является непостоянной величиной; оно изменяется, например, в зависимости от набухания клеток.

О высоком внутриклеточном сопротивлении говорят результаты, полученные при измерении его путем введения в клетки микроэлектродов. Однако такая операция для клеток далеко не безразлична и поэтому результаты могут не отражать истинной картины. Наиболее надежными следует считать данные, полученные при определении сопротивления взвесей клеток, которые имеют определенную геометрическую форму и объем которых может быть учтен. При этом использовалась формула, предложенная Максвеллом:

$$\frac{\frac{r_1}{r} - 1}{\frac{r_1}{r} + 2} = \rho\frac{\frac{r_1}{r_2} - 1}{\frac{r_1}{r_2} + 2}, \qquad (6.4)$$

---

[1] Из физики известна классификация проводников по удельному сопротивлению на 3 типа:

1. Проводники — до 10^3 *ом/см*.
2. Полупроводники — 10^4—10^{10} *ом/см*.
3. Диэлектрики — 10^{10} *ом/см*.

где r — удельное сопротивление всей суспензии,

r_1 — удельное сопротивление дисперсионной среды,

r_2 — удельное сопротивление клеток,

ρ — относительный объем, занимаемый дисперсной фазой.

Определение удельного сопротивления эритроцитов показало, что для постоянного тока оно измеряется величинами порядка 10^{12} *ом/см* — это уже величины, свойственные не полупроводникам, а диэлектрикам.

Точное определение сопротивления живых клеток и тканей сильно затруднено из-за чувствительности их к действию электрического тока. Приходится считаться с тем, что у всех клеток и тканей сопротивление изменяется при действии электрического тока: у одних — в большей степени, например, у таких легко возбудимых тканей, как нервы и мышцы, у других — в меньшей степени. Этим вызвана необходимость использовать в работе малое напряжение, что снижает точность метода.

Метод измерения электропроводности несмотря на все трудности позволяет работать с живым организмом, не нарушая его целостности и может быть применен ко всем живым клеткам и тканям.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ, УСТАНОВЛЕННЫЕ ПРИ ПРОХОЖДЕНИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

При пропускании постоянного тока через живые клетки и ткани было установлено, что сила тока не остается постоянной, а сразу же после наложения потенциала начинает непрерывно падать и, наконец, устанавливается на уровне, который во много раз ниже, чем исходный. Это объясняется тем, что при прохождении постоянного тока через биологическую систему в ней возникает нарастающая до некоторого предела электродвижущая сила противоположного направления. Эту встречную э.д.с. можно обнаружить, если отключить электроды от источника напряжения и быстро присоединить их к гальванометру. При этом будет зарегистрирован ток обратного направления, который будет спадать во времени. С возникновением встречной э.д.с. связано видимое отклонение от закона Ома. Формула закона Ома для данного случая принимает вид:

$$I = \frac{V-P}{R}, \qquad (6.5)$$

где функция времени $P = f(t)$

Наблюдаемое явление аналогично тому, что происходит в растворах электролитов. Для последних, как известно, характерно явление поляризации, т. е. образование при прохождении постоянного тока дополнительных зарядов за счет накопления ионов обратного знака.

Изменение силы тока в биологических системах свидетельствует о том, что они также обладают способностью поляризовать ток.

Количество электричества, накапливающееся в живых системах, не может быть обусловлено только значительной по величине статической емкостью, которая может быть рассчитана по формуле емкости конденсатора:

$$C=\frac{\varepsilon S}{4\pi d}, \qquad (6.6)$$

где ε — диэлектрическая постоянная,
S — площадь поверхности пластин конденсатора,
d — расстояние между пластинами.

Очевидно, к статической емкости прибавляется относительно большая поляризационная емкость. Это подтверждается тем, что емкость клеток и тканей не является постоянной, а зависит от напряжения и времени протекания тока. Величина поляризационной емкости может быть вычислена, исходя из начального и конечного значения силы тока, по формуле

$$C_p=\frac{\int\limits_0^T I\,dT}{R\,(I_0-I_T)}, \qquad (6.7)$$

где C_p — поляризационная емкость,
R — сопротивление,
I — сила тока,
I_0 — начальная сила тока,
I_T — конечное значение силы тока,
причем

$$\int\limits_0^T I\,dT=Q, \qquad (6.8)$$

где Q — количество электричества, накапливаемое за время T.

Поляризационная емкость различных биологических объектов, измеренная при постоянном токе (а также при токе низкой частоты), достигает больших величин — от 0,1 *мкф* на 1 *см*^{2} до 10 *мкф* на 1 *см*^{2} и даже более. У мышечных фибрилл краба самая высокая из известных для биологических объектов поляризационная емкость — до 40 *мкф* на 1 *см*^{2} (K. Cole, H. Curtis).

Важно отметить, что высокая поляризационная емкость — характерное свойство живых неповрежденных клеток.

Где же происходит поляризация в живых клетках и тканях?

Ранее мы говорили о поляризации в растворах электролитов. Она происходит на опущенных в раствор электродах. Адсорбция на них ионов приводит к образованию встречной электродвижущей силы. Явление поляризации при наложении электрического потен-

циала можно наблюдать и на других моделях — на кристаллах, на диэлектриках. При этом различаются два типа поляризации — поверхностная и объемная. Поверхностная поляризация, например, в кристаллах кальцита возникает вследствие накопления ионов в тонком поверхностном слое, прилегающем к электродам. Если сшлифовать верхний слой кристалла, то поляризацию наблюдать не удастся. Объемная поляризация, например, в кристаллах кварца происходит в результате накапливания заряда во всей толще образца и в этом случае снятие поверхностных слоев не ведет к исчезновению поляризации.

В отношении поляризации живых клеток и тканей было высказано предположение, что она вызывается свободными ионами и что поляризационная емкость сосредоточена на поверхности клеток. Однако привести достаточно убедительные экспериментальные данные, подтверждающие это предположение, нельзя. Более того, в настоящее время есть все основания считать, что поляризация возникает во всем клеточном объеме. Более подробно на этом вопросе мы остановимся позже.

Рассмотрим закономерности, установленные при прохождении электрического тока через биологический объект.

Определение сопротивления биологических объектов на постоянном токе сильно затруднено из-за наличия поляризации. Кроме того, при прохождении постоянного тока через живые клетки часто наблюдается дезинтеграция протоплазмы, что приводит к повреждению клеток и резкому повышению их электропроводности.

Как известно, во избежание поляризации при определении сопротивления растворов электролитов Кольрауш (Kohlrausch) предложил использовать переменный ток.

Естественным следует считать переход к использованию переменного тока и при работе с биологическими объектами.

В работе с живыми тканями на переменном токе используются компенсационные схемы со специальными мостами. При этом установлено следующее:

1) сопротивление биологического объекта переменному току ниже, чем постоянному току;

2) сопротивление не зависит от величины тока, если эта величина не превышает физиологическую норму;

3) острый минимум компенсации получается только при введении в переменное плечо схемы, наряду с омическим сопротивлением, емкости;

4) на данной частоте сопротивление биологического объекта постоянно, если не изменяется его физиологическое состояние;

5) сопротивление изменяется при изменении физиологического состояния объекта, при отмирании сопротивление падает.

Работы по измерению электропроводности живых клеток и тканей приобрели особенно большое значение после того, как

стало возможным проводить в одном опыте измерения на разных частотах.

Известно, что при пропускании переменного тока через растворы электролитов электропроводность их оказывается одинаковой независимо от частоты (во всяком случае, в диапазоне от нескольких *гц* до 10^6 *гц*).

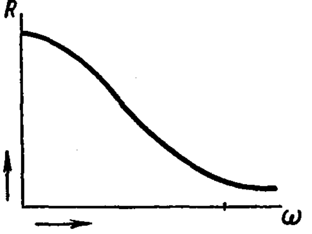


Рис. 54. Изменение сопротивления мышцы (R) при повышении частоты тока (ω)

При работе с биологическим объектом, а именно с кровью, Гебер обнаружил интереснейшую закономерность — электропроводность при высоких частотах (10^7 *гц*) оказалась гораздо выше, чем при низких частотах. Это подтвердилось последующими работами, показавшими, что электропроводность биологических объектов с увеличением частоты увеличивается до некоторой максимальной величины.

На рис. 54 приведена кривая зависимости сопротивления мышцы от частоты переменного тока, полученная в опытах Филлипсона (M. Philippson) в 1920 г.

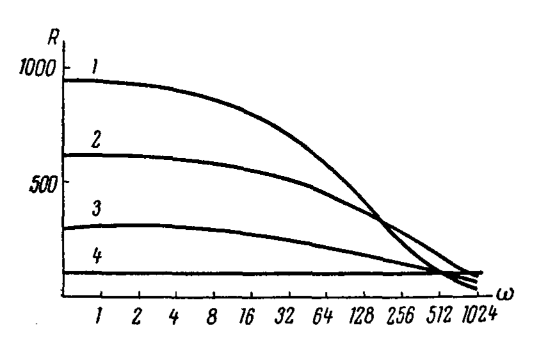


Рис. 55. Зависимость сопротивления (R) растительной ткани от частоты тока (ω) в норме и при отмирании:

1 — норма, *2* — нагревание при $t = 50°$ С в течение 2 *мин*, *3* — то же, в течение 4 *мин*, *4* — кипячение в течение 20 *мин*

Дальнейшие исследования показали, что такой характер кривой свойствен всем живым клеткам и тканям, независимо от различных абсолютных величин сопротивления. Зона дисперсии электропроводности обычно варьирует в интервале 10^2—10^8 *гц*. У многих объектов максимальная электропроводность наблюдается при частоте 10^6 *гц*, у *Bac. coli* — при частоте 10^8, а у нерва даже при частоте 10^9 *гц*.

Дисперсия электропроводности живых тканей является результатом того, что при низких частотах, как и при постоянном токе, электропроводность связана с поляризацией — по мере увеличения частоты поляризационные явления сказываются меньше.

Дисперсия электропроводности, как и способность к поляризации, присуща только живым клеткам. На рис. 55 представлены изменения, которые претерпевает кривая дисперсии электропроводности растительной ткани при отмирании (в данном случае

при воздействии высокой температуры). Из приведенных результатов следует, что крутизна кривой дисперсии по мере отмирания ткани уменьшается, т. е. наблюдается заметное уменьшение низкочастотного сопротивления, тогда как высокочастотное сопротивление практически остается неизменным.

Указание на уменьшение низкочастотного сопротивления при отмирании ткани было сделано еще Остергаутом. В дальнейшем измерение низкочастотного сопротивления стали применять для характеристики состояния ткани. Этот критерий использовался, например, при оценке жизнеспособности ткани, предназначенной для трансплантации. Однако получить абсолютные значения величины сопротивления трудно, так как эта величина сильно зависит от условий опыта, например от площади электродов, от расстояния между ними, от плотности прилегания ткани к электродам, от толщины объекта и т. д.

Для оценки физиологического состояния объекта более надежными следует считать данные, характеризующие крутизну дисперсии электропроводности. Получение всей кривой дисперсии иногда сопряжено с техническими трудностями. Б. Н. Тарусов предложил выражать крутизну дисперсии отношением величины сопротивления, измеренного на низкой частоте, к величине сопротивления, измеренного на высокой частоте, исходя из того, что если два сопротивления измеряются на разной частоте в одних и тех же условиях, то отношение между ними оказывается весьма постоянным для нормального состояния данной ткани. Для измерения сопротивления выбраны частоты 10^6 *гц* и 10^4 *гц*, так как во многих случаях при частоте 10^6 *гц* наблюдается максимальная электропроводность объекта, а при частоте 10^4 *гц* наблюдается перелом кривой дисперсии. Обычно рассчитывается коэффициент:

$$K = \frac{R_{10^4}}{R_{10^6}}. \qquad (6.9)$$

Однако учитывая то, что у некоторых клеток и тканей максимальная электропроводность достигается при бо́льших частотах, некоторые исследователи рассчитывают отношение сопротивления при частоте 10^4 *гц* к сопротивлению при бесконечно высокой частоте.

После отмирания ткани указанный коэффициент приближается к единице. В нормальных неповрежденных клетках и тканях его величина зависит от положения организма в эволюционном ряду. Например, K печени млекопитающих равен, примерно, 9—10, печени лягушки — 2—3. Для *Bac. coli* характерно еще более низкое значение $K = 1{,}5$—2. Величина коэффициента зависит также от способности ткани к обмену веществ. У органов с интенсивным обменом веществ таких, как печень, селезенка, он выше, чем, например, у мышц того же организма.

Изменение величины K в зависимости от физиологического состояния ткани может быть иллюстрировано. На рис. 56 пока-

зано изменение коэффициента $K = \frac{R_{10^4}}{R_{10^6}}$, рассчитанного для мышцы кролика при ее отмирании. Приведенные результаты (рис. 56, *А*) показывают, что высокочастотное сопротивление мышцы в данном случае в течение всего 30-часового опыта остается неизменным, а низкочастотное сопротивление уменьшается за это время в 5 раз. Следует указать, что изменение низкочастотного сопротивления удается заметить на самых ранних стадиях изменения функционального состояния клеток. Так , в опытах, результаты которых здесь приведены, уменьшение низкочастотного

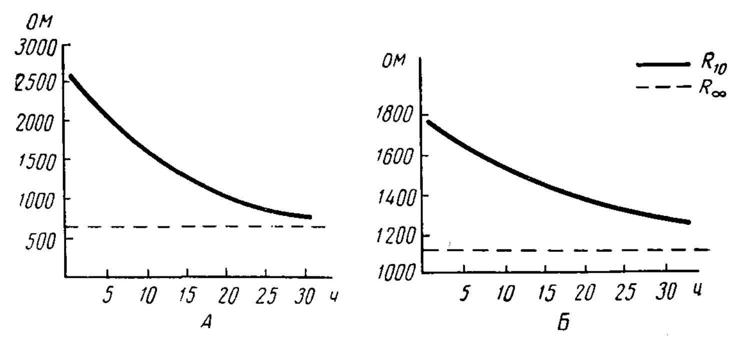


Рис. 56. Изменение величины коэффициента $K = R_{10^4}/R_{10^\infty}$: *А* — для мышцы кролика при ее отмирании ($t = +25°$ С); *Б* — для роговицы кролика при ее отмирании ($t = +20°$ С)

сопротивления было обнаружено раньше чем изменение реакции Харвея. (Эта реакция заключается в том, что ткань, окрашенная нейтральным красным и помещенная в 0,005 н. раствор $NaOH$, оказывается красной при нормальном физиологическом состоянии и желтой при отмирании). У другой ткани, например, у роговицы, интенсивность обмена веществ, а следовательно, и исходное значение *К*, ниже. Опыты показали (рис. 56, *В*), что при отмирании роговицы происходит меньшее изменение низкочастотного сопротивления.

Изменение дисперсии электропроводности клеток и тканей объясняется, как мы указывали, изменением их поляризационной способности; поэтому приведенный здесь коэффициент принято называть коэффициентом поляризации.

СУММАРНОЕ СОПРОТИВЛЕНИЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ (ИМПЕДАНС)

Объясняя закономерности, наблюдаемые при прохождении электрического тока через биологические объекты, исследователи исходят из того, что сопротивление живых клеток является сум-

марным и определяется прохождением тока через омическое сопротивление и через емкость.

Высокое сопротивление клеток и тканей постоянному току объясняется тем, что емкость в этом случае тока не пропускает. Для интерпретации результатов, полученных на переменном токе, появляется необходимость учитывать как омическое сопротивление, так и емкостное. Известно, что омическое сопротивление почти не зависит от частоты тока, а емкостное — значительно уменьшается по мере увеличения частоты, и это приводит к увеличению проводимости всей емкостно-омической системы.

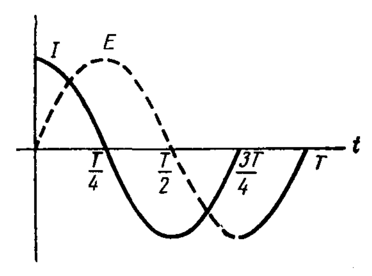


Рис. 57. Кривые изменения силы тока (I) и напряжения (E) при прохождении переменного тока через емкостное сопротивление

Исходя из сказанного, можно считать, что хорошо изученное явление дисперсии электропроводности клеток и тканей есть результат уменьшения емкостного сопротивления с увеличением частоты.

При высоких частотах увеличение проводимости клеток и тканей становится незначительным и постоянным, а при частоте порядка 10^6—10^8 *гц* имеет место максимальная проводимость — очевидно, емкостное сопротивление при этом практически отсутствует. Обычно принимают, что сопротивление току этой частоты определяется истинной концентрацией свободных электролитов в клетках.

Присутствие в биологических системах емкостных элементов подтверждается еще одним важным наблюдением — наличием сдвига фаз.

Сдвиг фаз невозможен, если на пути синусоидального переменного тока находится только омическое сопротивление. В этом случае кривая изменения силы тока за один полупериод совпадает с кривой изменения напряжения, т. е. угол сдвига фаз равен 0°. При прохождении переменного тока через емкостное сопротивление сила тока достигает максимального значения, когда величина переменной электродвижущей силы изменяется — спадает или нарастает наиболее круто, когда кривая изменения напряжения проходит через 0 (рис. 57); ток при этом на $\frac{1}{4}$ периода (T) обгоняет напряжение, т. е. угол сдвига фаз равен 90°.

В системах, имеющих и емкостное и омическое сопротивление, угол сдвига фаз определяется соотношением между ними.

Для биологических систем характерна большая величина угла сдвига фаз. Это показывает, что доля емкостного сопротивления в биологических объектах велика. Приведем некоторые величины

угла сдвига фаз, полученные на биологических объектах при частоте 10^3 *гц*:

нерв лягушки	64°
мышцы кролика	65°
кожа лягушки	55°
кожа человека	55°
валония	55°
ламинария	78°

Следует указать, что приведенные значения остаются постоянными при изменении частоты в широких пределах. Это объясняется тем, что биологические объекты являются емкостно-омическими системами, в которых емкость в основном не статическая, а поляризационная. Известно, что в системе со статической емкостью по мере увеличения частоты происходит увеличение проводимости и, следовательно, угла сдвига фаз. В системе с поляризационной емкостью соотношение тока, протекающего через емкость и через омическое сопротивление, остается в некоторых пределах частот постоянным.

Суммарная величина сопротивления живых объектов получила название импеданса. В электротехнике под импедансом понимают эффективное сопротивление, складывающееся из активного омического сопротивления (р е з и с т а н с а) и реактивного сопротивления, причем последнее (р е а к т а н с) включает в себя, кроме емкостного сопротивления, еще и индуктивное сопротивление цепи. Так как в биологических объектах самоиндукция не обнаруживается, то под импедансом мы понимаем геометрическую сумму омического и емкостного сопротивления живых клеток.

Для характеристики проведения тока живыми клетками прибегают к эквивалентным схемам, т. е. к таким комбинациям омического сопротивления и емкости, которые в первом приближении могут моделировать электрические параметры клеток.

Разберем простейшие эквивалентные схемы.

В случае последовательного соединения ток, идущий через омическое сопротивление, равен току, идущему через емкость: $I_R = I_C$.

Падение напряжения на сопротивление V_R и емкости V_C — разное:
$V_R = I_R \cdot R$; $V_C = I_C R_C$, где R_C — емкостное сопротивление. Общее приложенное напряжение — векторная сумма активной и емкостной составляющих: $\vec{V} = \vec{V}_R + \vec{V}_C$. При этом $V^2 = I_R^2 R^2 + I_C^2 R_C^2$, откуда $V = I\sqrt{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}}$ $\left(\text{так как } R_C = \frac{1}{\omega C}, \text{ где } \omega — \text{круговая частота в } гц\right)$. В результате импеданс (Z) равняется

$Z = \sqrt{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}}$, т. е. $Z = R - i\frac{1}{\omega C}$, где i — мнимая единица, т. е. $\sqrt{-1}$. (6.10)

Тангенс угла сдвига фаз определяется отношением:

$$\operatorname{tg}\varphi = \frac{V_C}{V_R} = \frac{I_C R_C}{I_R R} = \frac{\frac{1}{\omega C}}{R} = \frac{1}{\omega C R}. \qquad (6.11).$$

При параллельном соединении элементов напряжение, приложенное к активному сопротивлению и емкости, одинаково — $V = V_R = V_C$. Ток, протекающий через систему с параллельным соединением элементов, разветвляется и в сумме равен:

$$\vec{I} = \vec{I}_R + \vec{I}_C, \text{ где } I_R = \frac{V}{R}, \text{ а } I_C = \frac{V}{\frac{1}{\omega C}}.$$

При этом $I^2 = \frac{V^2}{R^2} + \frac{V^2}{\frac{1}{\omega^2 C^2}}$, откуда $I = V\sqrt{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2}$,

т. е. импеданс выражается формулой

$$Z = \frac{1}{\sqrt{1/R^2 + \omega^2 C^2}}.$$

В общем виде записываем:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + i\frac{1}{R_C}. \qquad (6.12)$$

Тангенс угла сдвига фаз определяется отношением:

$$\operatorname{tg}\varphi = \frac{I_C}{I_R} = \omega C R. \qquad (6.13)$$

Приведенные здесь простейшие схемы не могут быть полностью применены для живых клеток, потому, что обе эти схемы не удовлетворяют всему диапазону частот, в которых измеряется сопротивление живых клеток. В схеме с последовательным соединением емкости и омического сопротивления при низких частотах получаются бóльшие отклонения опытных значений импеданса от расчетных. Импеданс системы с параллельным соединением при больших частотах стремится к нулю, у живых же объектов суммарное сопротивление снижается только до определенной величины.

Для живых клеток, очевидно, характерно более сложное сочетание последовательного и параллельного соединений элементов.

Фрике и Морзе (H. Fricke a. s. Morse), измеряя сопротивление красных кровяных шариков, получили уравнения, которым соответствует схема, изображенная на рис. 58, I.

В. А. Петров (1939) провел исследование прохождения ступенчатого напряжения через нерв. Он допускает существование процессов, аналогичных электрическому разряду. Им предложена другая схема (см. рис. 58, II).

Несколько более сложную схему предложил Шван (рис. 58, III). Эти схемы в определенной степени могут служить моделями проведения тока живыми тканями. Однако ни одна из них не может в точности воспроизводить закономерности, присущие сложным биологическим системам.

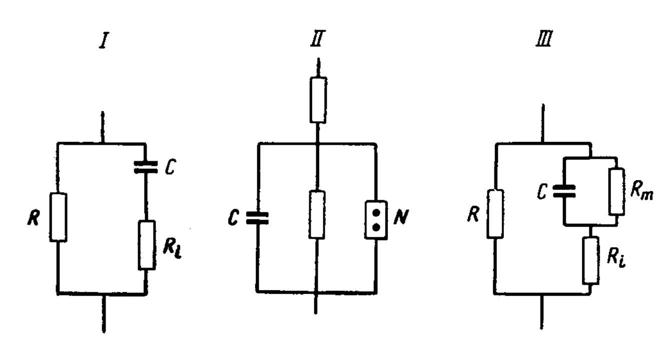


Рис. 58. Примеры эквивалентных схем: *I* — схема Фрике и Морзе; *II* — схема Петрова; *III* — схема Швана.
R — омическое сопротивление межклеточной жидкости, R_i — сопротивление содержимого клетки, *Rm* — омическое сопротивление мембраны, *C* — емкость мембраны, *N* — неоновая лампа — модель элемента, в котором происходит разряд

Многочисленными исследованиями установлено, что для *живых клеток и тканей характерно изменение импеданса при определении его на разных частотах переменного тока. При этом показано, что происходит изменение как реактивной, так и активной составляющих его.*

В практике при определении электропроводности живых систем в основном используются мостовые схемы с параллельным включением емкости и сопротивления в компенсирующее плечо. Такая схема может лишь в первом приближении моделировать живые клетки, однако пользуясь ею, удается получить довольно хорошую компенсацию.

Из электротехники известно, что в системе с параллельным соединением реактивная и активная составляющие сопротивления, являющиеся суть функциями частоты переменного тока, могут быть рассчитаны по формулам:

$$R_\omega = \frac{R}{1+(\omega CR)^2}, \qquad (6.14)$$

где R_ω — сопротивление активной составляющей;

$$X_\omega = \frac{\omega CR^2}{1+(\omega CR)^2}, \qquad (6.15)$$

где X_ω — сопротивление реактивной составляющей.

Частотная зависимость импеданса нередко выражается в виде круговой векторной диаграммы. Строится диаграмма таким обра-

зом (рис. 59): на оси абсцисс откладываются величины активного сопротивления объекта (R_ω), рассчитанные для каждой из испытанных частот, а на оси ординат — соответствующие величины реактивного сопротивления (x_ω), рассчитанные для тех же самых частот [1]. Величина активного сопротивления, соответствующего наименьшей частоте, оказывается наиболее отдаленной от начала осей координат, а величина активного сопротивления, измеренная на высокой частоте, будет ближе всего к началу осей координат. Реактивное сопротивление в этих крайних случаях — минимальное. Максимальные значения реактивного сопротивления лежат в области средних частот.

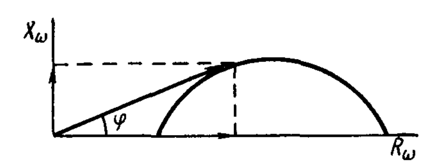


Рис. 59. Частотная диаграмма импеданса ткани *(импеданс-годограф)*. Объяснение см. в тексте

Объясняется это тем, что при низких частотах бо́льшая часть тока идет через омическое сопротивление; по мере увеличения частоты увеличивается доля тока, идущего через емкость, что приводит к увеличению электропроводности системы в целом, при высоких же частотах поляризационная емкость стремится к нулю.

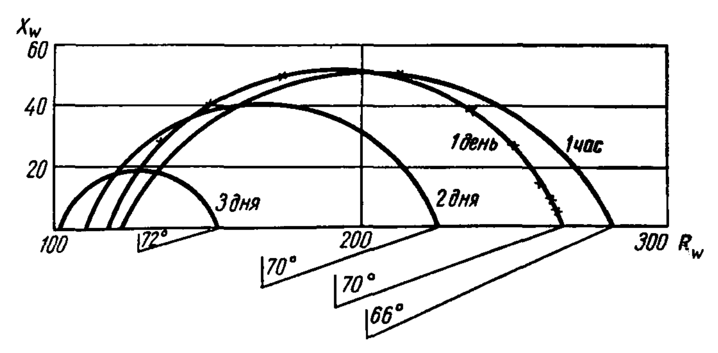


Рис. 60. Изменение импеданс-годографа ткани при ее отмирании. На графике указано время переживания (по Швану)

Импеданс (Z_ω) для каждой пары значений R_ω и X_ω рассчитывается по правилу сложения векторов:

$$Z_\omega = \sqrt{R_\omega^2 + X_\omega^2} \qquad (6.16)$$

и выражается графически прямой линией, проведенной из начала координат. При изменении частоты изменяется направление и длина вектора, и он своим концом обрисовывает дугу.

[1] Угол φ на круговой диаграмме является углом сдвига фаз для данной частоты тока.

Круговая диаграмма может быть использована так же, как и коэффициент поляризации, для оценки жизнеспособности тканей. При этом получается довольно четкая закономерность (рис. 60). Однако для характеристики физиологического состояния ткани удобнее пользоваться простым графическим изображением зависимости общего сопротивления от частоты. При таком способе на оси абсцисс откладывается логарифм частоты тока, а на оси ординат — величина суммарного сопротивления.

Критерием жизнеспособности является также изменение с частотой тангенса угла сдвига фаз, дающего представление о соотношении между величинами реактивного и активного сопротивлений

$$\operatorname{tg}\varphi = \frac{X_\omega}{R_\omega} = \omega CR. \tag{6.17}$$

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОЛЯРИЗАЦИОННЫХ ЯВЛЕНИЙ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ

Многие исследователи связывают механизм поляризационных явлений с наличием на поверхности клеток полупроницаемой мембраны. В основе мембранной теории лежит представление о том, что бо́льшая часть электролитов в протоплазме находится в свободном состоянии. Согласно этой теории клеточная мембрана в норме является непроницаемой для ряда ионов, например для ионов натрия, а ионы калия пропускает только в одном направлении — внутрь клетки. Возникновение поляризации объясняется следующим образом. При действии внешнего электрического поля ионы в клетках движутся соответственно их зарядам. Постепенно разноименно заряженные ионы концентрируются у противоположных участков внутренней поверхности клеточной мембраны, поскольку последняя непроницаема для этих ионов. Внутри клетки образуется поляризационное поле, противодействующее внешнему полю. Как только поляризация компенсирует напряженность внешнего поля, перемещение ионов прекращается, т. е. поляризация достигает максимума. Соответственно заряду, накопленному на внутренней стороне мембраны, с наружной стороны ее индуцируются ионы противоположного знака. При этом получается конденсатор, в котором мембрана служит диэлектриком. Сторонники этой концепции емкость клетки рассматривают как емкость мембраны, а сопротивление клетки, по их мнению, определяется как поверхностной проводимостью, т. е. проводимостью мембраны, которая, следовательно, не является идеальным диэлектриком, так и внутриклеточной электропроводностью.

По мере накопления фактических данных стали появляться возражения против этой концепции. Прежде всего трудности

возникли при объяснении структурных особенностей мембраны, которая должна односторонне пропускать калий и не пропускать натрий. Непосредственные же опыты, проведенные с радиоактивным натрием, показали, что он свободно проникает в неповрежденные клетки. Кроме того, если бы единственным поляризационным элементом клеток действительно являлась мембрана, то тогда имела бы место пропорциональность между изменениями емкости и омического сопротивления. Между тем, многочисленные исследования показали, что при действии раздражающих факторов изменения этих величин непропорциональны. Так, при повреждении клеток водоросли нителлы было обнаружено, что при увеличении электропроводности в 100 раз емкость уменьшалась всего на 15%.

При исследовании электрических параметров гемолизированных эритроцитов было обнаружено, что поляризационные свойства их долгое время не изменяются. Объяснять это тем, что остается неповрежденной клеточная мембрана, очевидно, нельзя, так как при этом наблюдается выход из клеток крупных молекул гемоглобина. Исследования такого рода заставляют сомневаться в том, что для объяснения поляризационных явлений достаточно существования полупроницаемой мембраны на поверхности клеток. Вероятно, есть основания утверждать, что наряду с поляризацией на поверхности клеток, поляризация возникает также и во всем клеточном объеме. В пользу этого говорят, в частности, известные опыты Блинкса (L. Blinks), проведенные на крупных клетках водорослей. Опыты показали, что при измерении электропроводности внутриклеточными электродами получаются величины такого же порядка, как и при наложении электродов снаружи.

Для живых объектов характерно высокое сопротивление. Поэтому естественно искать аналогию электрических свойств живых объектов с электрическими свойствами диэлектриков. Теория поляризации диэлектриков разработана Вагнером (K. Wagner). В ее основу положена гипотеза Максвелла о слоистой структуре диэлектриков. Разберем схему возникновения поляризации в гетерогенной системе, состоящей из двух слоев с разной электрической проводимостью. Предположим, что проводимость первого слоя (λ_1) меньше проводимости второго слоя (λ_2). Диэлектрические константы слоев соответственно будут ε_1 и ε_2, причем $\varepsilon_1 > \varepsilon_2$. При включении тока плотность заряда распределится соответственно диэлектрическим константам слоев: $\frac{\sigma_1}{\sigma_2} = \frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1}$, в данном случае плотность тока во втором слое (σ_2) будет больше. Количество ионов одноименного знака, уходящих из слоя с большей проводимостью, будет больше количества ионов, уходящих в слой меньшей проводимости. Вследствие этого у границы раздела слоев диэлектрика начнет накапливаться заряд, т. е. появится

вторичная электродвижущая сила обратного знака. Появление заряда на границе раздела вызовет изменение поля в слоях, а это вызовет, в свою очередь, изменение токов: во втором слое ток будет уменьшаться со временем, а в первом — увеличиваться. Процесс прекратится, когда токи в обоих слоях выровнятся. Поляризация при этом будет максимальной. Напряженность поля в слое с меньшей проводимостью станет больше, чем в слое с большей проводимостью.

Разработанная Вагнером теория дает возможность ближе подойти к пониманию поляризационных явлений в живых клетках. Живая клетка может быть рассмотрена как гетерогенная система, состоящая из слоев с различной проводимостью. В этом случае поляризация может иметь место во всем объеме клетки. Различная проводимость слоев может быть обусловлена рядом факторов, например разной вязкостью, разной растворимостью ионов в слоях.

Представление, согласно которому клетка рассматривается как слоистый диэлектрик, в принципе не приводит к отказу от мембранной теории возникновения поляризации, а является дополнением ее. В этом случае также предполагается ионный механизм поляризации. Система, состоящая из мембраны с низкой проводимостью и раствора электролитов внутри нее, может рассматриваться как частный случай гетерогенного двухслойного диэлектрика.

По мнению сторонников фазовой теории, поляризация во всем объеме протоплазмы будет иметь место уже потому, что дисперсионная среда и дисперсионная фаза протоплазмы должны обладать разной проводимостью и разными диэлектрическими постоянными (Тарусов, 1939). Такого же рода поляризация наблюдается при пропускании электрического тока через гомогенную среду, в которой эмульгировано или суспендировано вещество с иными электрическими свойствами.

К тому времени, когда были накоплены многочисленные факты, указывающие на то, что существенная часть ионов в клетке находится в связанном состоянии, возник вопрос о наличии в клетке диэлектрической поляризации, вызванной смещением связанных зарядов.

Как показал Дебай (P. Debye), диэлектрик, не содержащий свободных ионов и не ограниченный изолирующим материалом, обладает такими же диэлектрическими свойствами, как и диэлектрик гетерогенной структуры. Поляризация может возникать в электрическом поле за счет смещения орбитальных электронов атомов. Молекула, в которой «центр тяжести» положительных зарядов не совпадает в пространстве с положением «центра тяжести» отрицательных зарядов, под влиянием электрического поля приобретает электрический момент (μ) и становится упругим диполем:

$$\mu = el, \tag{6.18}$$

где e — заряд электрона,

l — расстояние между зарядами.

Следует заметить, что, во-первых, для поляризации такого типа требуются большие напряжения и, во-вторых, величина такой поляризации очень невелика. Бóльших величин диэлектрическая поляризация достигает при смещении ионов, закрепленных в кристаллической решетке. Обе эти поляризации устанавливаются за очень короткое время — за 10^{-6}—10^{-8} *сек*. Для биологических объектов они мало реальны.

Однако косвенные данные говорят о том, что диэлектрическая поляризация в биосубстрате существенным образом связана с дипольными молекулами.

Большинство органических соединений является перманентными диполями, с большим постоянным электрическим моментом, который у крупных молекул белка равен 10^{-16}.

При наложении электрического поля последнее может не вызывать изменения расположения зарядов в молекуле, а приводить к ориентации молекул в направлении силовых линий. Согласно теории Дебая, *поведение системы, включающей в себя полярные молекулы, определяется временем релаксации, т. е. временем, в течение которого происходит поляризация в результате поворота молекул в электрическом поле*. Время релаксации (τ) зависит от величины полярного момента, от вязкости среды, от температуры и приближенно может быть вычислено по формуле Стокса:

$$\tau = 4\pi \frac{\eta a^3}{kT}, \qquad (6.19)$$

где a — радиус молекулы,

k — постоянная Больцмана,

T — температура,

η — вязкость.

Говоря о влиянии температуры на дипольную поляризацию, следует подчеркнуть, что влияние это двоякое. При повышении температуры уменьшается вязкость, что облегчает поворот молекул, и одновременно возрастает дезориентирующая роль броуновского движения, что оказывает противоположное действие.

При наложении переменного тока он идет через систему, содержащую диполи, во время поворота последних. Когда кончается поворот, ток перестает идти. Если система содержит и диполи, и свободные ионы, то по окончании поворота ток снизится.

В аспекте теории Дебая большое значение приобретают диэлектрическая константа вещества и диэлектрические потери.

Если измерять диэлектрическую константу (функцию величины поляризации) системы, содержащей диполи при повышающихся частотах переменного тока, то обнаруживается, что величина ε остается высокой и постоянной до определенной частоты тока, после чего диэлектрическая константа начинает падать

с увеличением частоты до некоторого предела, т. е. имеет место зона аномальной дисперсии. Механизм этого явления следующий. Если в системе, находящейся в переменном электрическом поле, время релаксации меньше, чем $\frac{1}{\omega}$, то молекулы успевают за изменением знака и ε неизменно, но если время релаксации становится больше $\frac{1}{\omega}$, то диполи не будут успевать поворачиваться вслед за полем и с увеличением частоты все меньшее количество диполей будет принимать участие в поляризации. При высокой частоте определенного значения дипольная поляризация совсем не будет иметь место и диэлектрическая проницаемость снова станет стабильной.

В результате вращения диполей в переменном электрическом поле происходит выделение тепла. Диэлектрические потери при определенной частоте оказываются максимальными. Наличие максимума потерь объясняется следующим образом. При низких частотах имеют место большие простои молекул, при повышении частоты простои уменьшаются и выделяется больше тепла. Но если период тока станет меньше времени релаксации и молекулы не успеют сделать поворот, то потери уменьшаются. Очевидно, максимумы потерь в разных системах будут разные.

При анализе электрических свойств тканей необходимо учитывать сложность структуры последних. Ткани состоят из клеток, окруженных мембранами, обладающими низкой электрической проводимостью по сравнению с материалом, находящимся внутри клеток и окружающим клетки. Различные клеточные органоиды (ядро, митохондрии и др.) в свою очередь также снабжены мембранами. Раствор окружающий субклеточные компоненты и заключенный внутри них, содержит много макромолекулярных образований. Внутриклеточная и тканевая жидкость содержит также большое количество солей.

Имеющийся в настоящее время материал об электрических свойствах клеток и тканей недостаточен для решения вопроса о механизме поляризационных явлений в биологических системах, так как и при мембранной, и при гетерогенной, и при дипольной структурах имеет место емкостное сопротивление и дисперсия электропроводности.

На большую вероятность того, что поляризация живых клеток является не только ионной поляризацией, указывают данные о температурной зависимости электрических свойств клеток. Движение ионов в клетке зависит от вязкости дисперсионной среды протоплазмы. В интервале разностей температур, при которых существует большинство биологических объектов (от 0° до +35°), вязкость коллоидов протоплазмы изменяется значительно, в то время как различия в электрических свойствах клеток в этом температурном интервале невелики.

Данные, показывающие, что молекулы белков нуклеопротеидов имеют значительный полярный момент и что в растворах их можно наблюдать дисперсию диэлектрической проницаемости, являются косвенным подтверждением предположения о дипольной поляризации в клетке.

Основная масса молекул, входящих в состав протоплазмы, по-видимому, обладает большим числом полярных групп. Это подтверждается, например, образованием различных ориентированных структур при действии на протоплазму повреждающих агентов. Поэтому наблюдаемые у биологических объектов дисперсионные явления стали объясняться в основном смещением зарядов, вследствие поворота полярных молекул. В дальнейшем некоторыми авторами было отмечено, что *диэлектрическая поляризация в живых системах может быть обусловлена также смещением зарядов внутри структурных элементов*, состоящих из большого числа молекул (макроструктурная поляризация).

Возможен и другой механизм поляризационных явлений в клетках, связанный с полиэлектролитными свойствами биополимеров (H. Schwan). Молекула биополимера в растворе превращается в полиэлектролитный ион. Последний притягивает из раствора ионы противоположного знака. В результате вокруг полиэлектролитного иона образуется ионная атмосфера, которая поляризуется при действии внешнего поля. *Поляризация ионной атмосферы суммируется с поляризацией самого биополимера. В живом веществе поляризация может быть вызвана внутримолекулярным перемещением электрических групп*, подобно тому, как это происходит в сегнетодиэлектриках. Известно, что у сегнетодиэлектриков сильно выражены электрополяризационные свойства. Ряд аномалий, обнаруженных при накладывании электрического переменного тока на сегнетодиэлектрики, заставил отказаться от гипотезы дипольной поляризации. Было высказано предположение, что поляризационная активность сегнетодиэлектриков является результатом перемещения элементов внутри молекул. Изменение электрических параметров сегнетовой соли при замещении водорода на его изотоп дейтерий привело к выводу о зависимости поляризации от перемещения водорода в решетке. Для того, чтобы наблюдать такого рода поляризацию, необязательно, чтобы вещество являлось истинным полупроводником. Достаточно, чтобы имела место делокализация электронов. Делокализация электронов обнаруживается экспериментально по сужению линий электронного парамагнитного резонанса. Указанный эффект наблюдается и у биополимеров. Это говорит о том, что у последних можно ожидать наличие полупроводниковых свойств.

Для выяснения вопроса о том, каким образом электрическая характеристика ткани связана с ее молекулярной структурой, большое значение имеет раздельное изучение активной и реактивной составляющих тока общей проводимости.

Считают, что активная составляющая может быть отнесена за счет ионных компонентов и определяется их числом, зарядом и подвижностью. Что же касается плотности поляризационного тока, то она определяется произведением числа диполей на дипольный момент и подвижность молекул.

Установлено, что зависимость емкости и омической проводимости клеток от частоты переменного тока различна. Так, в опытах с бактериальной взвесью обнаружено, что дисперсия емкости (а следовательно, и ε) и живых клеток наблюдается в диапазоне от 10^8 до 10^3 *гц*, а зона дисперсии омического сопротивления лежит в диапазоне 10^6 — более 10^8 *гц*. Аналогичные данные получены и для других клеток.

Несоответствие между зонами дисперсии диэлектрической постоянной и омической проводимости дает основание предполагать, что эти дисперсионные процессы развиваются в разных фазах живой протоплазмы. *Дисперсия диэлектрической постоянной, очевидно, обусловлена крупными органическими молекулами, несущими связанные заряды, а дисперсия омического сопротивления, наблюдаемая при более высоких частотах, электролитной фазой.* Последнее подтверждается тем, что в растворах электролитов в области ультравысоких частот действительно наблюдается дисперсия сопротивления.

При определении электропроводности биоструктур очень показательно и методически удобно выражать результаты в виде частотной зависимости тепловых потерь. При наличии общего тока проводимости наблюдается два рода тепловых потерь — поляризационные потери ориентационного происхождения и омические потери. Из векторной диаграммы токов устанавливается величина тангенса угла потерь, измеряемая отношением активного тока к поляризационному. Зависимость тангенса угла потерь от частоты тока при параллельном включении эквивалентных R и C следующая:

$$\operatorname{tg}\delta = \frac{1}{\omega CR}, \qquad (6.20)$$

Частота переменного тока, при которой происходит максимальное поглощение мощности электромагнитного поля полярными молекулами, а следовательно, имеет место максимум $\operatorname{tg}\delta$, выражается формулой Дебая:

$$\omega_m = \frac{12kT}{\eta a^3},$$

где k — константа Больцмана,
T — абсолютная температура,
a — размер молекул,
η — вязкость среды.

По этой формуле можно вычислить размер молекул, релаксирующих на данной частоте. Результаты, показывающие изменение $\operatorname{tg}\delta$ и сдвиг его максимума, могут говорить о процессах полимери-

зации или деполимеризации молекул живой ткани. Многочисленными исследованиями установлено, что тепловые потери в клетках имеют несколько максимумов. Это говорит о том, что *в клетках в поляризационных явлениях принимают участие несколько групп молекул с разными полярными моментами.*

Период собственных колебаний электромагнитного поля, при котором происходит максимальное поглощение мощности, вычисленный для полярных молекул тканей (а именно — для молекул разных белков и молекул воды при комнатной температуре), соответственно равен:

для молекул белков — $\omega_m = 6 \cdot 10^7$ *сек*$^{-1}$ ($\lambda = 0{,}8 \div 8$ *м*);
для молекул воды — $\omega_m = 2{,}8 \cdot 10^{12}$ *сек*$^{-1}$ ($\lambda = 0{,}3$ *см*).

По теории Дебая для однородных сред отношение граничных частот, при которых происходит изменение электрических параметров, равно 100. Вследствие неоднородности живых тканей изменение их электрических параметров наблюдается как в области дециметровых — метровых волн (резонанс белковых молекул), так и в области сантиметровых волн (резонанс молекул воды).

Обобщение диэлектрических свойств тканей приводит к суммарной частотной характеристике, из которой следует, что при диэлектрических измерениях можно различать три области дисперсии: α-, β-, γ-дисперсии (Шван, 1957).

α-Дисперсия занимает область низких частот звукового диапазона. При таких частотах трудно получить точные значения ε, так как эксперимент сильно затруднен из-за поляризации электродов. В этой области дисперсии приобретает решающее значение эффект поверхностной поляризации частиц (клеток и органоидов, окруженных мембранами; коллоидных частиц; молекул белков). Как сплошные, так и окруженные мембраной частицы обнаруживают одинаковые свойства при низких частотах. Это убедительно показывают, что наблюдаемая дисперсия обусловлена не свойствами самой мембраны, а свойствами поверхности частиц. По мере увеличения частоты полная поверхностная проводимость увеличивается. Других диэлектрических явлений, которые служили бы источником частотных зависимостей, в этой области, лежащей ниже характеристической частоты полярной дисперсии, не возникает. Это подтверждают измерения, проведенные на альбумине при частоте ниже 100 *гц*.

β-Дисперсия занимает широкую область частот, в которой существует зависимость дисперсии от вида объекта. Вплоть до частот порядка 10^6—10^7 *гц* дисперсия в большой мере определяется поверхностной поляризацией. На это дисперсионное явление наслаивается дисперсия, связанная с поляризационными свойствами молекул. Очевидно, максимум потерь в области частот порядка 10^4 *гц* обусловлен молекулярными свойствами высокополимерных соединений протоплазмы, а максимум потерь в области более высоких частот — свойствами веществ с меньшими молекулами.

В последнее время границы применения метода электропроводности расширены при использовании токов сверхвысокой частоты (больше 10^8 *гц*). Измерение комплексной диэлектрической проницаемости тканей при таких частотах оказалось возможным при помощи несколько модифицированных известных в радиотехнике волноводных и резонансных методов. Результаты показали, что значения диэлектрической проницаемости тканей зависят от содержания воды в последних. Ткани с большим содержанием воды обладают высокими значениями диэлектрической проницаемости, а ткани с малым содержанием воды — низкими. Значение диэлектрической проницаемости крови примерно на 30% ниже соответствующего значения для воды. Обнаружено, что диэлектрическая проницаемость гемоглобина в диапазоне 100—1000 *мгц* изменяется в зависимости от частоты. При объяснении этого явления возникли большие трудности. При таких высоких частотах влияние поверхностной поляризации уже не сказывается. Существование дисперсии при этих частотах показывает, что роль поверхностной поляризации ограничена. При указанных частотах нельзя ожидать и релаксационной поляризации протеиновых молекул, так как частота релаксации их около 10 *мгц*. Что же касается полярных свойств молекул воды, то в данном диапазоне они еще не проявляются. Для объяснения дисперсии диэлектрической проницаемости в данном диапазоне частот высказано два независимых предположения. Первое сводится к тому, что отдельные части протеиновых молекул обладают степенями свободы вращения и частоты релаксации этих частей выше, чем у молекулы в целом. Измерения, проведенные на молекулярных соединениях, сравнимых по размеру и свойствам с полярными группами в молекуле гемоглобина, подтвердили это предположение. Для некоторых аминокислот и пептидов обнаружен спектр частот релаксации от 400 до 3000 *мгц*. Другое предположение состоит в том, что молекулы воды, гидратирующие молекулу гемоглобина, с диэлектрической точки зрения находятся между льдом и свободной водой, обладая частотами релаксации в диапазоне 300—500 *мгц*. В этом случае дисперсией диэлектрической проницаемости «связанной воды», которая будет иметь место в более широком диапазоне частот, обусловливается дисперсия диэлектрической проницаемости крови.

Характер дисперсии при частотах выше 1000 *мгц* удовлетворительно объясняется полярными свойствами молекул свободной воды. Эта третья область дисперсии, лежащая в диапазоне сантиметровых волн, обозначается как γ-дисперсия.

Дисперсия диэлектрической проницаемости тканей с малым содержанием воды (жировая ткань, костная ткань) обусловливается, в основном, их структурой. В микроволновом диапазоне частот диэлектрические параметры таких тканей практически частотно независимы.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Вопрос о механизме проведения электрического тока в биологических объектах в настоящее время нельзя считать решенным окончательно. Однако работы, выполняемые при использовании метода электропроводности, имеют большую ценность. Метод нашел широкое применение при изучении процессов, происходящих в живых клетках и тканях при изменении физиологического состояния, в результате действия некоторых химических веществ и физических факторов, а также для оценки патологических процессов.

Например, при воспалении на первых стадиях наблюдается увеличение сопротивления тканей. Этот эффект, особенно выявляющийся при измерениях в области низких частот, может быть объяснен следующим образом. Ток низкой частоты идет преимущественно через межклетники, представляющие собой чисто омическое сопротивление. При воспалении в результате набухания клеток сечение межклеточных пространств уменьшается и происходит повышение омического сопротивления. На первой стадии процесса воспаления структура клеток еще заметно не изменяется и емкость сохраняет свою величину. Очевидно, всегда увеличение омического сопротивления при сохранении емкости говорит о набухании тканей, а уменьшение омического сопротивления при сохранении емкости, наоборот, свидетельствует об уменьшении объема клеток. Эти изменения омического сопротивления клеток происходят в ответ на внешние раздражения, не выходящие за пределы физиологических норм. При более сильных воздействиях происходят глубокие структурные изменения, сопровождающиеся уменьшением емкости.

Исследование методом электропроводности процессов, развивающихся в организме в результате действия ионизирующих излучений, показали, что уже на ранних стадиях поражения происходят существенные изменения клеточной структуры. Сдвиг максимума тангенса угла потерь говорит о том, что в клетках после облучения имеют место процессы полимеризации. На рис. 61 представлены результаты, полученные для соединительной ткани. Аналогичные измерения проведены на ткани печени и на мышечной ткани.

Обратное явление наблюдается при процессах новообразования. Так, на ранних стадиях превращения нормальных клеток в раковые обнаруживается повышение емкостного сопротивления. В более поздние сроки в опухолях наряду с молодыми клетками присутствуют и распавшиеся, и поэтому увеличение емкости в молодых клетках маскируется.

Об определенных структурных изменениях, происходящих на макромолекулярном уровне, говорят также данные о сдвиге

максимума tg δ в процессе адаптации тканей скелетной мускулатуры животных к гипоксии.

Измерение электрических параметров часто применяется при изучении физиологического состояния клеток кожи. Ток, проходя через кожу, проникает сначала через верхний роговой слой, обладающий в сухом состоянии очень высоким сопротивлением, затем через нижележащий слой клеток почти без межклетников

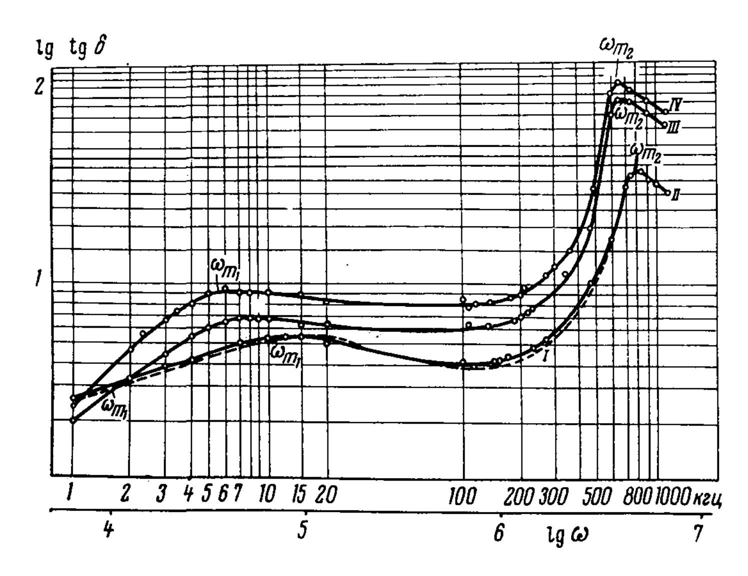


Рис. 61. Частотная зависимость tg δ для кожной соединительной ткани облученной морской свинки (доза — 650 *р*). I — исходная кривая (до облучения); II — через 30 *мин* после облучения; III — через 9 *ч* после облучения; IV — через 18 *ч* после облучения:

ω_{m_1} — релаксационная частота в звуковой области спектра, ω_{m_2} — релаксационная частота в области радиоспектра

и далее попадает в хорошо проводящий слой подкожной клетчатки. Такое распределение сопротивлений является причиной того, что величина сопротивления кожи, бо́льшая в области низких частот, не зависит от расстояния между электродами. При определении измеряется вертикальное сопротивление слоя клеток. Результаты исследований показали, что при раздражении омическое и емкостное сопротивление кожи падает.

Использование сверхвысоких частот в биологических исследованиях дает возможность по диэлектрическим свойствам судить о степени гидратации тканей. Проводимость и диэлектрическая постоянная ткани при увеличении содержания воды в последней увеличивается от значений, характерных для плотных тканевых

компонентов, до значений, характерных для растворов электролитов.

Сравнительно недавно возрос интерес к проблеме, связанной с воздействием на организмы коротких, ультракоротких и сантиметровых волн. При действии этих волн поглощение энергии различными клетками и клеточными компонентами определяется их физико-химическими свойствами. В результате происходит неодинаковый нагрев клеточных элементов, отличающихся разными электрическими характеристиками. Этот искусственно вызванный местный нагрев, как известно, используется с терапевтическими целями. Причем неизбежно возникают вопросы: как глубоко проникает искусственно вызванное тепло и как можно оценить его количество, образующееся во время сеанса диатермии. Решение этих вопросов требует предварительного изучения электрических свойств тканей в соответствующем диапазоне частот. Неодинаковый нагрев разных клеточных участков может вызвать нарушение координации биохимических реакций и привести к образованию несвойственных клетке продуктов. Изучение возможных повреждений тканей, связанных с воздействием высокочастотного излучения, также предполагает детальное знание диэлектрических свойств биологического объекта.

ГЛАВА VII

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Вопрос о природе возбуждения — один из узловых вопросов биологии и, в частности, биофизики.

Возбуждением (в широком смысле) *называется ответ живой протоплазмы на внешнее воздействие изменением характера или интенсивности протекающих в ней процессов.* Способность протоплазмы к такому ответу называется возбудимостью.

Возбудимость развилась из способности первых примитивных организмов восстанавливать те повреждения белковой структуры, которые возникали при столкновении с достаточно резкими изменениями среды.

В процессе эволюции возникли специализированные возбудимые ткани, осуществляющие связь между органами — регулирование и координацию работы целого организма. Такими специализированными возбудимыми тканями являются нервная и мышечная ткань. Они отличаются тем, что в них возбуждение может быстро распространяться от места его возникновения. Следует, однако, отметить, что четкой границы между специализированными возбудимыми тканями и другими тканями проводить нельзя: к проведению возбуждения (правда, с малыми скоростями) способны и растительные ткани, например, клетки водоросли *Nitella*, проводящие пучки в стеблях некоторых высших растений, и др. Переход от состояния покоя к состоянию активной деятельности четко выражен у желез, яйцеклетки и других образований.

В этой главе рассматривается, главным образом, возникновение и распространение возбуждения в специализированных тканях — в нервах и, отчасти, в мышцах. Вопросы же механизмов мышечного сокращения разбираются в гл. 10 этой книги.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ УЧЕНИЯ О ВОЗБУЖДЕНИИ

Физиологи, изучающие проблему возбуждения в XIX в., интересовались, в первую очередь, специализированными возбудимыми тканями. Они должны были найти критерии, позволяющие судить о возникновении возбуждения. Для работы с нервами были подобраны только два удобных критерия: сокращение мыш-

цы, иннервируемой данным нервом, и появление потенциала действия нерва. Отчасти поэтому и произошло встречающееся до сих пор смешение двух не вполне тождественных по существу понятий — возбуждения и электрической активности.

Связь возбуждения с развитием электрической активности была четко показана Дюбуа-Реймоном (E. Du Bois-Reymond), который в середине XIX в. поставил свой классический опыт с регистрацией отрицательного колебания потенциала покоя мышцы

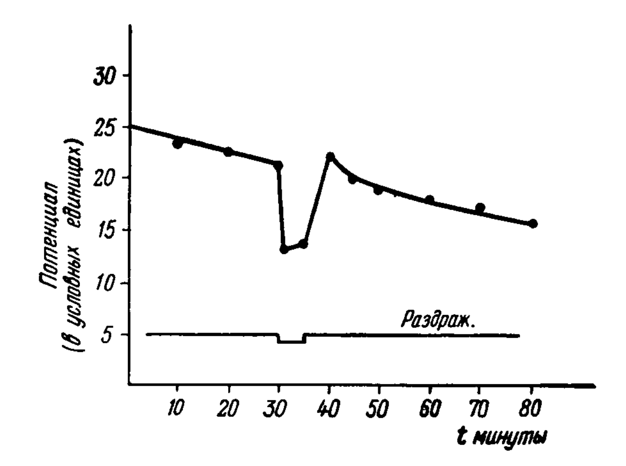


Рис. 62. Отрицательное колебание потенциала покоя икроножной мышцы лягушки. Потенциал покоя резко изменяется в момент возбуждения мышцы при нанесении раздражения

(рис. 62). С именем Дюбуа-Реймона связана и первая попытка трактовки механизма возникновения биоэлектрических потенциалов.

Как известно, для отведения потенциала покоя от мышцы или нерва необходимо соединить неповрежденную поверхность объекта с поврежденным участком. Альтерацию (повреждение) обычно наносят разрезом или прижиганием. При этом оказывается, что поврежденный участок заряжен отрицательно по отношению к участку неповрежденному. Дюбуа-Реймон выдвинул гипотезу, согласно которой электрические свойства мышцы обусловлены так называемыми периполярными молекулами.

В модели периполярные молекулы заменены медными шариками с цинковыми поясками (рис. 63). При этом цинк несет заряд +, а медь —. При таком условии к поперечному разрезу нерва или мышцы будут обращены отрицательно заряженные части молекул, а к продольной поверхности — положительные. Следовательно, при отведении потенциала покоя выявляются постоянно суще-

ствующие отношения, потенциал покоя предсуществует. Предполагается также, что при раздражении периполярные молекулы могут менять свою ориентацию, что и приводит к появлению отрицательного колебания потенциала покоя. Таким образом, гипотеза Дюбуа-Реймона связывала явления возбуждения лишь с перемещением молекул, которые сами при этом не претерпевали никаких изменений.

Другая точка зрения была высказана в 1867 г. учеником Дюбуа-Реймона Германом (L. Hermann). Он считал, что потенциал покоя возникает как следствие альтерации, наносимой разрезом или другим повреждением. Герман предполагал, что при раздражении и повреждении происходят изменения в самих молекулах возбудимого субстрата. Настоящим функциональным изменением является расщепление этих молекул.

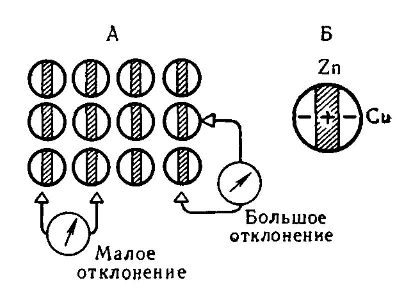


Рис. 63. Модель возбудимого образования (по Дюбуа — Реймону): *А* — общее строение модели; *Б* — строение отдельного металлического шарика, имитирующего периполярную молекулу

Так возникли две теории, легшие в основу всех существующих и в настоящее время представлений о развитии возбуждения и, главным образом, о возникновении биопотенциалов — теория предсуществования и теория альтерации.

И та и другая теории в момент своего возникновения были еще в значительной мере умозрительными. Прямые экспериментальные обоснования должны были придти позже, с дальнейшим развитием физики и химии.

Однако в следующие годы альтерационная теория Германа была если не забыта, то во всяком случае надолго оставлена. Что касается теории Дюбуа-Реймона, то она претерпела быстрое и значительное изменение и прочно вошла в рабочий арсенал электрофизиологов.

ЗАКОНЫ РАЗДРАЖЕНИЯ

К концу XIX в. физиология накопила большой экспериментальный материал о возникновении и распространении возбуждения.

Было сформулировано 4 важнейших правила, называемых иногда законами раздражения.

1. *Закон сокращения Пфлюгера* показывает, при каких случаях раздражения нерва постоянным током возникает сокращение мышцы (табл. 6 и рис. 64).

2. *Закон раздражения Дюбуа-Реймона* говорит о том, что для достижения порога раздражения сила тока должна нарастать с определенной скоростью. При медленном нарастании силы тока

возбуждение не наступает. Объяснение этого явления пришло много позже.

Таблица 6

Сила тока	Восходящий ток		Нисходящий ток	
	Замыкание	Размыкание	Замыкание	Размыкание
Слабая	+	—	+	—
Средняя	+	+	+	+
Сильная	—	+	+	—

Закон Дюбуа-Реймона тесно связан с третьим необходимым условием наступления возбуждения — определенной длительностью раздражения.

3. *Закон длительности раздражения.* Время действия тока является фактором, определяющим силу порогового раздражения.

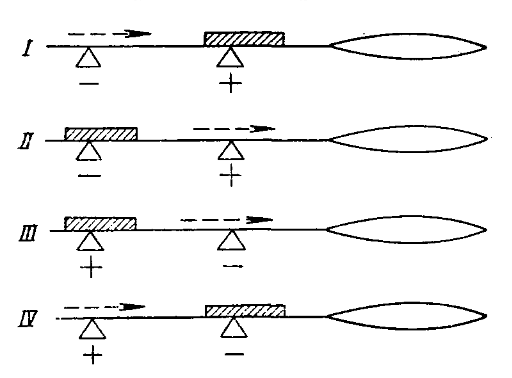


Рис. 64. Схема, поясняющая «закон сокращения»: I — восходящий ток, замыкание; II — восходящий ток, размыкание; III — нисходящий ток, замыкание; IV — нисходящий ток, размыкание.

Штриховкой обозначен участок пониженной возбудимости, стрелкой — движение волны возбуждения

Выводя свой закон на основании опытов на нерве лягушки, Дюбуа-Реймон видел, что эффект от протекания тока в течение 0,01 *сек* и 2 *сек* одинаков. В его опытах имела значение только крутизна нарастания импульса. Но Фик на мышце анадонты и Энгельман (T. Engelmann) на мышцах мочеточника кролика показали роль фактора времени. Наблюдения Энгельмана иллюстрируются данными, приведенными в табл. 7.

Таким образом, было установлено, что при длительности протекания тока меньшей, чем некоторая критическая величина, никакая его сила не вызовет возбуждения; наоборот, после некоторой определенной длительности дальнейшее протекание тока уже не имеет значения. Величина «полезного времени», т. е. времени, необходимого для вызова возбуждения, весьма варьирует у разных объектов.

4. *Рефрактерность.* После осуществления акта возбуждения в возбудимом образовании наступает состояние рефрактерности — временной невозбудимости. Наличие рефрактерности после

протекания акта возбуждения было установлено Мареем в 1876 г. на сердце лягушки. Он нашел абсолютный рефрактерный период равным десятым долям секунды. Полное восстановление возбудимости происходит здесь за 0,8 *сек*.

Таблица 7

Длительность тока (в *сек*)	Пороговая сила постоянного тока (в условных единицах)[1]
0,25	4000
0,5	500
1	50
3	15
5	11

[1] Физиологи часто пользуются условными единицами для обозначения силы раздражения, так как абсолютные измерения здесь очень затруднены. Можно измерить потенциал от данного стимулятора, но раздражает не потенциал, а протекающий ток, а последний измерять труднее, так как сопротивление объекта может значительно меняться.

Позднее в опытах на нерве лягушки Люкасом (K. Lucas) была получена кривая, показывающая изменение возбудимости

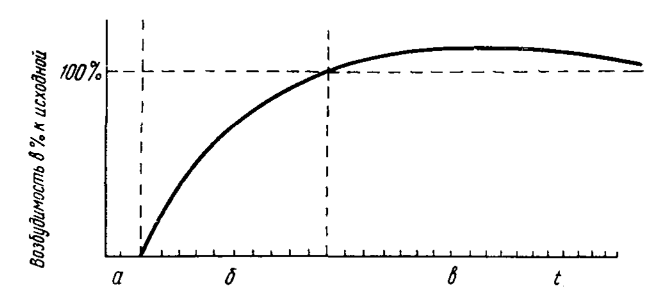


Рис. 65. Кривая изменения возбудимости нерва лягушки после возникновения в нем импульса:

а — абсолютная рефрактерная фаза, *б* — относительная рефрактерная фаза, *в* — фаза экзальтации, пунктирная линия — нормальный уровень возбудимости

после осуществления возбуждения. Абсолютный рефрактерный период здесь равен 0,002 *сек*. Затем наступает относительный рефрактерный период, длящийся 0,01 *сек*. Интересно, что через 0,012 *сек* после первого раздражения наступает период экзальтации — фаза повышенной возбудимости (рис. 65).

Накопленные факты требовали интерпретации. Необходима была теория, которая могла бы удовлетворительно объяснить: почему раздражающий стимул должен обладать определенной силой, длительностью и конфигурацией;

почему возбужденный участок негативируется, т. е. каким образом возникает биоэлектрический потенциал;

почему возбудимое образование приходит в состояние рефрактерности после осуществления акта возбуждения;

и, наконец, какие процессы дают необходимую для осуществления возбуждения энергию.

ИОННЫЕ ТЕОРИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Теория возбуждения Нернста. Основанием для создания первой физико-химической теории возбуждения послужила появившаяся в 1887 г. работа шведского физико-химика Аррениуса «О диссоциации растворенных в воде веществ». Аррениус показал, что молекулы солей, кислот и оснований в водных растворах диссоциируют — распадаются — на катионы и анионы. Такая диссоциация определяет, например, электропроводность растворов (ионы обладают различной подвижностью). Различие в подвижности ионов может приводить к возникновению разности потенциалов в разных участках растворов и к появлению во внешней цепи концентрационных или диффузионных токов.

Таблица 8

Подвижность некоторых катионов и анионов при +18° С (в *см²ом⁻¹г-экв⁻¹*)

H^+	314,5	OH^-	174
Li^+	33,4	Cl^-	65,6
Na^+	43,5	Br^-	67
K^+	64,6	J^-	66,5
NH_4^+	64,4	NO_3^-	61,7
Zn^{2+}	46	MnO_4^{2-}	53,5
Fe^{2+}	45	SO_4^{2-}	68
Fe^{3+}	43	CO_3^{2-}	60

Аррениус развивал свою теорию безотносительно к биологическим явлениям. Для построения теории возбуждения концепцию Аррениуса впервые использовал Нернст в 1899 г.

Нернст представлял клетку как раствор электролитов, окруженный полупроницаемой мембраной. Влияние электрического раздражения рассматривалось как аналогичное влияние электрического тока на растворы. Нернст считал, что в клетке положительные и отрицательные ионы, двигаясь в противоположных направлениях, накапливаются у мембран на соответствующих концах клетки. На наружной же стороне клетки накапливаются ионы противоположного знака из окружающей клетку среды. Получается нечто вроде конденсатора, прокладкой которого является клеточная мембрана.

Согласно гипотезе Нернста, возбуждение наступает тогда, когда концентрация электролитов у мембраны достигает определенной величины и происходит как бы «пробой» конденсатора. Предел поляризации, необходимой для наступления возбуждения, может весьма варьировать у разных возбудимых образований и определяется для каждой ткани опытным путем.

В общем виде это положение выражается формулой:

$$C - C_0 = \gamma i \sqrt{\frac{t}{k}}, \tag{7.1}$$

где γ — количество ионов, переносимых единицей силы тока,
i — сила тока,
k — коэффициент диффузии для данного иона,
C_0 — концентрация свободных ионов при покое,
C — концентрация свободных ионов при возбуждении.

Главные переменные величины в этом уравнении — сила тока и время его действия — i и t.

Нернст строил свою теорию для электрического раздражения, которое может осуществляться действием постоянного тока, разрядом конденсатора или переменным током.

В случае постоянного тока:

$$i\sqrt{t} = \text{const}. \tag{7.2}$$

Для разряда конденсатора:

$$V\sqrt{C} = \text{const}, \tag{7.3}$$

где V — напряжение, C — емкость конденсатора, с которой, как известно, связано время его разряда.

Если же раздражение вызывается переменным током, то поляризация происходит в течение одного полупериода синусоиды. Если за это время поляризация достигнет необходимого уровня, наступит возбуждение

$$\frac{i}{\sqrt{n}} = \text{const}, \tag{7.4}$$

где n — частота переменного тока.

Ясно, что при увеличении частоты переменного тока необходимо увеличивать и его силу, чтобы достичь возбуждения. Т. е.

$$\frac{i_1}{\sqrt{n_1}} = \frac{i_2}{\sqrt{n_2}} = \frac{i_3}{\sqrt{n_3}} = \ldots\ldots \frac{i_n}{\sqrt{n_n}} = \text{const}.$$

Таким образом, устанавливается, что *для достижения порога раздражения данного возбудимого образования необходимо затрачивать некоторое постоянное количество энергии.*

Выведя это правило, Нернст тем самым объяснил, почему между силой и длительностью раздражающего стимула должно быть строго определенное соотношение. Однако как оказалось, правило Нернста справедливо только для довольно узкого диапа-

зона частот — от приблизительно 100 *гц* до 2—3 *кгц*. При более высоких частотах — порядка десятков килогерц — формула принимает вид:

$$\frac{i}{n^p} = \text{const}, \tag{7.5}$$

где p — может колебаться от 0,5 до 1.

При еще более высоких частотах — от 100 000 *гц* и выше — неприменима уже и эта формула. Токами Д'Арсанваля ($1{,}5 \cdot 10^5$—10^3 *гц*) вообще не удается достичь порога раздражения. Переменный ток таких частот оказывает на живые ткани только тепловое действие. На этом основано применение указанных токов в физиотерапии для глубокого прогревания ткани. При применении высокочастотных токов большой силы — порядка ампера — можно поднять температуру прогреваемого участка тела на несколько градусов, но мышечных сокращений при этом не будет и раздражающего действия тока пациент не ощущает.

Итак, экспериментальные данные говорят о том, что порог возбуждения не может быть достигнут, если раздражение длится очень долго, но сила его мала, или если сила раздражения велика, но длится оно очень короткий промежуток времени. Необходимые интервалы времени сильно отличаются у разных биологических объектов.

Таблица 9

Объект исследования	«Полезное время» (порядок величины)
Хромосомы водорослей	Десятки секунд
Гладкая мышца желудка лягушки	Секунды
Мышца сердца моллюска	Десятые доли секунды
Мышца ноги моллюска	Сотые доли секунды
Двигательный нерв лягушки	Тысячные доли секунды
Двигательный нерв теплокровных	Десятитысячные доли секунды

В 1901 г. Вейс (M. Weiss) предложил выражать взаимную зависимость силы и продолжительности тока формулой

$$i = \frac{a}{t} + b, \tag{7.6}$$

где a и b — эмпирические константы.

Существование констант связано с тем, что кривая, выражающая зависимость необходимой силы тока от полезного времени (рис. 66), никогда полностью не приблизится к осям координат. Особенно заметно это относительно оси абсцисс — начиная с некоторого момента, кривая идет параллельно ей. Это отражает тот факт, что сила, ниже пороговой, не вызывает возбуждения ни при какой длительности раздражения.

Уравнение (7.6) применимо к большему диапазону частот, чем уравнение Нернста. Если же применять его к раздражениям весьма малой или весьма большой длительности, то в первом случае оно примет вид:

$$i = \frac{a}{t},$$

так как отношение $\frac{a}{t}$ будет очень велико и константой b можно будет пренебречь, а во втором — $i = b$, так как при большом t отношение $\frac{a}{t}$ станет очень малым. По существу «полезное время»—это критическая длительность действия наименьшего тока, способного вызвать возбуждение.

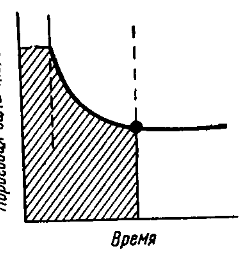


Рис. 66. Схема, поясняющая понятие «полезного времени». Вне заштрихованной зоны зависимость между пороговой силой тока и временем его действия не выявляется

Величина полезного времени говорит об уровне возбудимости ткани. Поэтому большое значение в практике, клинической например, приобрело предложенное французским ученым Лапиком (L. Lapicque) понятие «хронаксии». Хронаксия — необходимое время раздражения при силе тока, равной двум реобазам. Реобаза — минимальная сила тока, необходимая для получения порогового ответа при длительном действии стимула. По образному выражению Ляпика, «каждый орган отсчитывает время при помощи своей собственной единицы измерения». Но закономерности при этом одинаковы для самых разных возбудимых объектов (рис. 67). На примере хронаксии подтверждается предположение об общности основ возбуждения для всех живых существ. Следует упомянуть, что хронаксия изменяется в зависимости от физиологического состояния ткани.

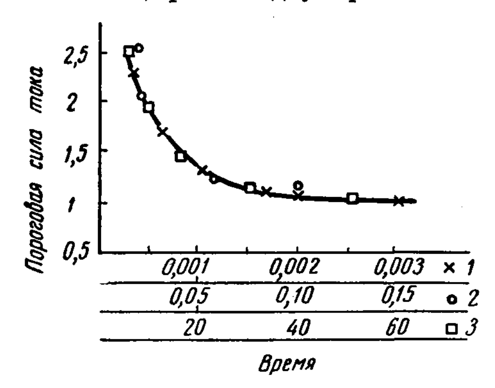


Рис. 67. Зависимость между силой тока и временем его действия для различных возбудимых объектов (нанесенные на одну систему координат):

1 — для икроножной мышцы лягушки, 2 — для ноги улитки, 3 — для водоросли (спирогира). По оси абсцисс — время в секундах; по оси ординат — пороговая сила тока в условн. ед.

Понятия «полезного времени» и хронаксии очень важны для практической и экспериментальной работы, но они ничего не говорят о существе процессов, происходящих в живой ткани при нанесении раздражения.

Остается неясным, почему длительно протекающий ток малой силы не вызывает возбуждения и почему так важен закон раздражения Дюбуа-Реймона, говорящий о роли крутизны нарастания раздражающего импульса? Эти явления не получили исчерпывающего объяснения в теории Нернста. Но уже тогда была предпринята попытка связать их со способностью живой ткани приспосабливаться к действию медленно нарастающего раздражения — с аккомодацией.

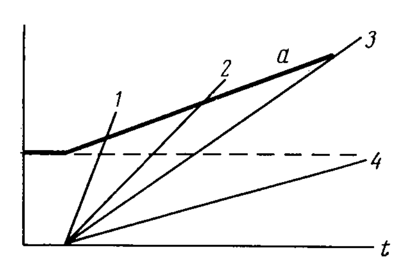


Рис. 68. Схема, поясняющая понятие аккомодации:

кривая *a* — повышение порога возбуждения, *1*, *2*, *3*, *4*, — постепенное (с разной скоростью) нарастание силы раздражающего импульса

Понятие аккомодации было введено Нернстом. Он предполагал, что аккомодация связана с изменением свойств клеточных мембран при медленном воздействии на них ионов (рис. 68). Позднее была предложена формула, дающая количественное выражение аккомодации:

$$-\frac{dV}{dt}=\frac{V-V_0}{\lambda}, \tag{7.7}$$

здесь V_0 — исходный порог возбуждения данной ткани,
V — новый порог, возросший в результате аккомодации,
λ — константа аккомодации, определяемая в опыте.

Каждая ткань имеет свою константу аккомодации. Эта константа может служить характеристикой возбудимых образований.

Нернст так формулировал основное положение своей теории: «... гальванический ток может вызвать в организованной ткани, т. е. в проводнике, имеющем характер электролита, только смещение ионов и, следовательно, изменение концентрации. Из этого мы заключаем, что последнее должно быть причиной физиологического эффекта. При переменном токе изменения концентрации следуют изменениям направления тока. Если изменение концентрации достигает известного предела, то наступает физиологическое действие, т. е. достигается порог раздражения».

Теория Нернста, по существу, была не столько теорией возбуждения, сколько теорией электрического раздражения, имеющей довольно ограниченное применение. Эта теория давала объяснение действия раздражающего стимула в определенных временных границах, но она не объясняла явления рефрактерности и ничего не говорила о механизме возникновения биэлектрического потенциала. Совершенно не касалась эта теория и еще двух важных вопросов — механизма распространения возбуждения и энергетического обеспечения этого процесса.

Гипотеза Чаговца. Нернст, говоря о роли изменения концентрации электролитов для возникновения возбуждения, не называл конкретно какие-либо ионы. Но одновременно с работой Нернста велась другая работа, тоже связанная с исследованием роли электролитов в биологических явлениях. Это была работа русского ученого В. Ю. Чаговца, посвященная механизму возникновения биопотенциалов. Он считал, что если в живых тканях образуется электролит, который диссоциирует на ионы, имеющие разную подвижность, произойдет разделение этих ионов в силу процесса диффузии. Диффузия будет идти в ту часть ткани, где концентрация данного электролита мала. Разделение ионов приведет к возникновению диффузионной разности потенциалов, величина которой вычисляется по предложенной Нернстом формуле:

$$E=\frac{U-V}{U+V}\cdot\frac{RT}{nF}\ln\frac{P}{P_1}, \tag{7.8}$$

где U — подв. катионов,

V — подв. анионов.

Чаговец считал, что угольная кислота является тем электролитом, который ответствен за возникновение биопотенциалов. Было известно, что при возбуждении мышц в них усиливается обмен веществ. При повреждении, которое также является сильным раздражением, в раздраженном участке увеличится концентрация угольной кислоты. Подвижность же катиона (водорода) и аниона (угольной кислоты) весьма различна. Следовательно, создаются условия для возникновения потенциала повреждения.

Гипотеза Чаговца могла бы служить развитием альтерационной теории. Однако эта гипотеза встретила серьезные возражения. Во-первых, в опыте получались величины биопотенциалов бóльшие, чем те, которые можно было вычислить по формуле. Во-вторых, поперечный разрез мышцы не обнаруживал кислой реакции. Эти два обстоятельства заставляли думать о видоизменении гипотезы. Уже и ранее высказывалась мысль, что больший потенциал можно получить и при работе с ионами не слишком различных подвижностей, если на пути таких ионов стоит полупроницаемая мембрана. Тогда подвижность непроникающего иона равна 0, а потенциал можно рассчитывать по той же формуле и получать заметные разности потенциалов даже для ионов, имеющих в растворах одинаковую подвижность — например, K^+ и Cl^-.

Мембранная теория. Мысль об участии полупроницаемых мембран в создании значительных разностей потенциалов принадлежала Оствальду. И именно эта мысль легла в основу мембранной теории, которая явилась непосредственным развитием взглядов Дюбуа-Реймона. Автором этой теории был ученик Дюбуа-Реймона — Бернштейн (J. Bernstein).

По Бернштейну, всякая живая клетка окружена мембраной, которая пропускает одни ионы и не пропускает другие и поэтому может поляризоваться. Бернштейн не связывал мембрану ни с какими морфологическими образованиями. Было известно, что мембраной обладают растительные клетки — на них наблюдали явления тургора и плазмолиза. Предположение, что мембрана может быть и у животных клеток, возникло тогда, когда были получены данные о разном ионном составе клеток и окружающей среды. Тогда было установлено, что внутри клеток преобладает K, а снаружи — Na. Эти данные использовал Бернштейн. Он предположил, что клеточные мембраны проницаемы только для ионов калия и непроницаемы для ионов натрия. Если это так, то калий может свободно выходить из клетки в окружающую среду, но не может удалиться от мембраны, так как его удерживает притяжение находящихся внутри клетки анионов, для которых мембрана непроницаема. Таким образом, создается поляризация мембраны, и потенциал покоя можно зарегистрировать, если ввести один электрод внутрь клетки, а другой приложить к ней снаружи. Поскольку потенциал покоя, по предположению Бернштейна, есть потенциал мембраны, поляризованной в силу своей полупроницаемости, внутри клетки должны находиться отрицательно заряженные ионы, а снаружи — заряженные положительно.

В норме вся мембрана поляризована в равной степени. При повреждении анионы начинают свободно выходить из клетки вместе с ионами K. Так возникает отрицательный заряд поврежденных участков по отношению к участкам неповрежденным. При повреждении всей мембраны в целом выход анионов наружу идет по всей поверхности равномерно и потенциал от двух соседних участков, как и в норме, отвести нельзя. Так бывает при гибели клетки.

При возбуждении мембрана также становится полностью проницаемой и возбужденный участок негативируется, однако это явление временное и хорошо обратимое. По окончании возбуждения мембрана восстанавливает свою полупроницаемость, и ионы калия возвращаются в клетку.

Мембранная теория не давала ответа на вопрос о том, каким образом мембрана, по окончании возбуждения, восстанавливает свою полупроницаемость и как ионы K возвращаются внутрь клетки против концентрационного градиента. Затем появились и другие возражения против мембранной теории (см. гл. 8), но применительно к вопросам о возникновении возбуждения наиболее важно то, что мембранная теория совершенно не касалась вопроса о роли протоплазмы в развитии возбуждения. Она сосредоточила внимание исследователей только на вопросах передвижения ионов, в первую очередь K^+, Na^+ и Cl^-, из клетки в окружающую среду и обратно. Действительно, наблюдения над перемещением

ионов позволяли хорошо объяснять и предсказывать величины потенциалов покоя и действия, и изменения их в разных условиях. Однако биоэлектрические потенциалы, хотя и очень тесно связаны с развитием и распространением возбуждения, отнюдь не отражают всей картины изменений, происходящих при этом в живых клетках.

Правда, в нервных и мышечных волокнах высших животных во время прохождения волны возбуждения долгое время не удавалось наблюдать каких-либо изменений в состоянии протоплазмы. Но было хорошо известно, например из работ Ферворна (M. Verworn, 1914), что нанесение раздражения низко организованным существам, таким как амеба, ведет к отчетливо заметному обратимому помутнению протоплазмы. Трудно представить, что усложнение и совершенствование возбудимых образований в ходе эволюции могло привести к полному отделению функции возбуждения от работы всей протоплазмы клетки и что во время возбуждения в протоплазме нервных и мышечных волокон не происходит никаких изменений.

Для биофизики особенно интересны те исследования, которые стремятся выяснить, какая роль в развитии возбуждения принадлежит всей протоплазме в целом. Роль ионов в возникновении возбуждения можно рассматривать не только в аспекте развития биоэлектрической активности, но и в аспекте изменения состояния всей протоплазмы. Отправной точкой для таких исследований служат наблюдения, показавшие, что соотношение концентраций различных ионов как в клетках, так и в окружающей среде в значительной степени определяют функциональное состояние клеток, в том числе и уровень их возбудимости.

Антагонизм ионов. Первые указания на роль отдельных ионов в физиологических процессах были получены Рингером (S. Ringer) в 1887 г. Он нашел, что изотонический раствор NaCl поддерживает работу сердца лягушки в течение меньшего времени, чем такой же раствор с добавлением солей калия и кальция. Раствор, получивший имя Рингера, широко применяется в лабораториях.

Вопрос о роли соотношения разных ионов очень подробно исследовал Жак Лёб. Он нашел чрезвычайно удачный объект для своих опытов — рыбку *Fundulus*. Эта рыбка способна переносить очень большие колебания осмотического давления водной среды, что позволяло работать с растворами электролитов самых разных концентраций.

На рыбке *Fundulus* можно было вести опыты в условиях, в которых другие животные погибли бы просто за счет изменения осмотического давления.

Было установлено, что икринки рыбки *Fundulus* не развиваются в чистом растворе NaCl. Если же к этому раствору прибавить некоторое количество раствора $CaSO_4$, часть икринок образует зародыши. Так, если к 100 *см*^{3} 5/8 М-ного раствора NaCl

(в котором икринки погибают) прилито 2 *см*³ 1/64 М-ного раствора $CaSO_4$, зародыш образуется в 20% икринок; при добавлении 4 *см*³— 75%, а при добавлении 8 *см*³ число развившихся икринок снижается до 70%. Опыты указывают на существование какого-то оптимального соотношения между количествами ионов Na и Ca в растворе.

Лёб поставил опыты во многих вариантах и нашел, что к раствору NaCl можно добавлять не только соли Ca и Mg—элементов постоянно присутствующих в морской воде, но Co, Ni, Sr и других двухвалентных ионов. Он показал, что две соли, чистые растворы которых ядовиты для объектов, в смеси оказываются безвредными.

Впоследствии многочисленными опытами разных авторов было установлено также, что скелетные мышцы и сердце позвоночных животных теряют возбудимость при помещении в раствор, содержащий только один катион — K или Ca. В чистом растворе NaCl возбудимость мышц сохраняется довольно долго, но гораздо дольше — многими часами и даже сутками живет препарат сердца или мышцы в рингеровском растворе. В чистом растворе NaCl через 1—2 *ч* мышца теряет непрямую возбудимость и в то же время начинает ритмически самопроизвольно сокращаться. Это явление Лёб связал с уменьшением в мышце содержания Ca. Опыты с солями, осаждающими Ca, подтвердили это предположение. Ритмические сокращения мышцы возникали и тогда, когда ионы Na вводились внутрь мышцы.

Итак, многочисленный экспериментальный материал показывает, что *нормальная возбудимость возможна только тогда, когда в биологических жидкостях присутствуют и одно- и двухвалентные катионы.*

Очевидно, что во всех описанных случаях дело не ограничивается лишь передвижением ионов из окружающей среды в клетку и обратно. Для биофизика неизбежно возникает вопрос, какие физико-химические механизмы можно привлечь для объяснения наблюдаемых явлений?

Как известно, электролиты могут вызывать коагуляцию коллоидов. Однако особенно интересно то, что коагулирующее действие электролитов зависит не только от концентрации, но и от скорости добавления растворов электролитов к коллоидным растворам и от соотношения количества одно- и двухвалентных ионов в растворе электролита.

Одна из первых попыток объяснить некоторые стороны явления возбуждения с позиций коллоидной химии была предпринята Гёбером в 1914 г.

Как указывалось выше, Нернст связывал явление аккомодации с воздействием ионов на клеточные мембраны. Гёбер уточнил это, высказанное в общей форме, предложение. Он исследовал коагулирующее действие электролитов на лиофильные коллоиды. Было обнаружено, что большое значение имеет

скорость приливания раствора электролита к коллоидному раствору. При быстром приливании электролита концентрация раствора, необходимая для того, чтобы вызвать коагуляцию, оказывалась значительно ниже, чем при медленном приливании. Все изложенные выше данные были использованы П. П. Лазаревым при построении ионной теории возбуждения.

Теория Лазарева. Строя свою теорию возбуждения, Лазарев исходил из положения, что *для поддержания нормального уровня возбудимости в живых системах, как и для поддержания определенного состояния физико-химических систем, необходимо определенное соотношение одно- и двухвалентных катионов.*

$$\frac{C_{Na+K}}{C_{Ca+Mg}} = \text{const}.$$

Как и Нернст, Лазарев предполагал, что ионы электролитов находятся в живой клетке в свободном состоянии и под действием электрического тока движутся к полупроницаемым мембранам и скапливаются около них. Однако решающим моментом для наступления возбуждения Лазарев считал не создание у этих мембран определенных общих концентраций электролитов, а нарушение обычных соотношений между количеством одно-и двухвалентных катионов.

Лазарев считал, что при обычном невозбужденном состоянии ионы K и Ca распределены в клетке равномерно (в нерве лягушки, приблизительно, на один ион Ca приходится 20 ионов K). Под влиянием приложенного напряжения и ионы K и ионы Ca движутся к катоду, но с различной скоростью. Кальций, обладающий большим зарядом и имеющий большую сольватную оболочку, встречает при движении большее сопротивление, чем калий. Поэтому у мембраны сначала накапливаются ионы K, а ионы Ca отстают. Получается двойной микрослой, и создаются условия для наступления коагуляции белков. Лазарев и связывал наступление возбуждения с обратимой коагуляцией белков клетки.

По Лазареву, возбуждение наступает при

$$\frac{C_1}{C_2 + b} = \text{const},$$

где C_1 — концентрация K,
C_2 — концентрация Ca,
b — константа.

Если же коагуляция наступает под влиянием не двух ионов, а большего числа их, то:

$$A = \Sigma a_1 c_1 + \Sigma a_2 c_2,$$

где c_1 — суммарная концентрация одновалентных ионов,
c_2 — суммарная концентрация двухвалентных ионов,
a_1 и a_2 — константы, которые могут иметь одинаковые или противоположные знаки.

Впоследствии наблюдения ряда авторов, в частности Насонова и Александрова, подтвердили, что во время возбуждения вязкость протоплазмы увеличивается. В ряде случаев при возбуждении обратимо возникают структурные образования, отсутствующие в покоящейся клетке, например нейрофибриллы.

Что дала теория Лазарева для объяснения известной экспериментаторам феноменологии возбуждения?

Основной закон раздражения Пфлюгера гласит: при замыкании постоянного тока возбуждение возникает на катоде, при размыкании — на аноде. При замыкании тока ионы К и Са движутся к катоду и именно здесь нарушается нормальное соотношение между этими катионами, приводящее к обратимой коагуляции. При размыкании тока начинается диффузия ионов в обратном направлении, ионы К опять-таки опережают ионы Са и необходимое для коагуляции соотношение возникает теперь в области анода. Таким образом, гипотеза Лёба — Лазарева дает хорошее объяснение эмпирически выведенному основному закону раздражения.

Введенное Нернстом понятие аккомодации также получило в теории Лёба — Лазарева более детальную расшифровку. Действительно, согласно этой теории, порог возбуждения непосредственно связан с порогом коагуляции белков протоплазмы, а этот порог, как указывал Гёбер, повышается при медленном приливании электролита к коллоидному раствору. При медленном усилении тока необходимое для коагуляции разделение ионов К и Са у мембраны достигается не сразу, а порог коагуляции к этому моменту может быть уже повышен за счет влияния небольшого количества ионов, пришедших к мембране в начале действия раздражителя. Надо оговорить, что окончательной расшифровки механизма аккомодации на сегодняшний день еще нет.

Как и Нернст, Лазарев строил свою теорию применительно к электрическому раздражению, но впоследствии он нашел, что влияние механического раздражения, изменений температуры, химических агентов в конечном счете также сводится к изменению ионных соотношений.

При механическом раздражении — ударе или сжатии — происходит быстрое выдавливание воды через полупроницаемую мембрану и, следовательно, повышение концентрации белков и электролитов в месте раздражения. Ионы начинают диффундировать в соседние участки протоплазмы, где концентрация их меньше. Ионы К при диффузии опережают ионы Са и создается необходимое для наступления возбуждения соотношение. Если же сжатие производится медленно, фильтрация и диффузия также происходят постепенно и нужное разделение одно- и двухвалентных катионов может и не наступить.

При изменении температуры — в допустимых для живых организмов пределах — осмотическое давление в участке с более высокой температурой оказывается выше, чем в участке с темпе-

ратурой пониженной. Диффузия идет от нагретого участка к охлажденному, что опять-таки может привести к созданию оптимальных для коагуляции условий.

Эффективность воздействия на клетку химических агентов Лазарев связывал с отнятием воды, а потому и диффузией солей из раздражаемого участка. При быстром высушивании, действительно, удается получить возбуждение. Однако такую трактовку все же надо считать слишком упрощенной. Действующий на клетку химический агент может вступать в реакцию с раздражаемым субстратом и вряд ли в этом случае дело можно сводить к простой диффузии свободных ионов.

Для того чтобы очень интересная для биофизики теория Лазарева могла получить дальнейшее развитие, необходимо было показать, какие именно обратимые изменения состояния протоплазмы происходят при возбуждении. Это надо было исследовать на простейших организмах и на возбудимых тканях высших животных. Материал по этому вопросу дают классические исследования Ферворна, а затем Насонова и Александрова, Унгара (G. Ungar) и других исследователей, работающих уже в наши дни.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Изменения физико-химического состава протоплазмы при возбуждении. Рассмотренные выше гипотезы предполагали, что первопричиной возникновения возбуждения служат изменения ионных концентраций. Изменению физико-химических свойств протоплазмы при переходе клетки в состояние возбуждения отводилась при этом роль конечного звена. Между тем, естественно предполагать, что именно изменениям самой протоплазмы принадлежит главная роль в явлениях возбуждения. Эту мысль весьма четко обосновал Д. Н. Насонов.

Насонов так формулировал в общем виде свою теорию: протоплазма — это не смешивающаяся с водой фаза. Распределение веществ в клетке и во внешней среде определяется не проницаемостью оболочек, а растворимостью данного вещества в протоплазме и в воде, адсорбцией веществ на мицеллах и химическим связыванием веществ с белками субстрата (см. гл. 5). Электролиты большей частью связаны с белками и лишь небольшая часть их находится в свободном состоянии. При повреждении и возбуждении протоплазма теряет свои фазовые свойства. По окончании акта возбуждения фазовые свойства протоплазмы восстанавливаются.

По Насонову, в эволюции сперва возникла способность белка восстанавливать структуру, нарушенную воздействием извне; затем возникла способность к уходу от опасности и, наконец, высшая форма возбуждения — сигнализация, необходимая сложному многоклеточному организму.

Таким образом, между раздражением и повреждением, как и между ответами на эти воздействия, нельзя проводить резкую грань. Разница, в основном, заключается в силе воздействия.

Насонов и его сотрудники занимались исследованием изменения протоплазмы живых клеток при таких воздействиях как повышение температуры, действие лучистой энергии, постоянного и переменного тока, различных химических веществ и т. п. Для регистрации возникающих в клетках изменений использовались различные оптические и физико-химические методы, измерение pH и др.

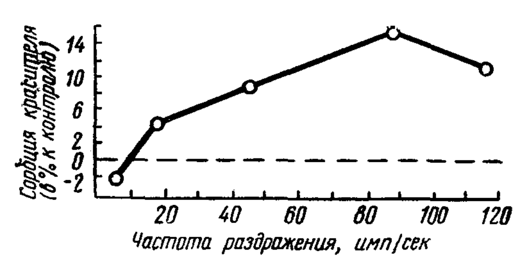


Рис. 69. Сорбция нейтрального красного нервом краба при раздражении его индукционным током различной частоты (по Насонову)

В результате очень большого числа наблюдений было установлено, что при любых внешних воздействиях в протоплазме происходит:

а) уменьшение степени дисперсности коллоидов, что можно видеть, наблюдая протоплазму в темном поле микроскопа. При воздействии раздражающих факторов появляется бледно-голубое свечение, а затем в протоплазме возникают структуры, ярко светящиеся в темном поле. Сперва эти структуры возникают в ядре, потом в цитоплазме. В норме, как известно, ядро живой клетки трудно наблюдать в микроскоп — оно оптически «пустое» и заметно, главным образом, благодаря оболочке. Если наблюдать при помощи простого микроскопа, видно, как при раздражении протоплазма мутнеет и в ней становятся видны структуры;

б) увеличение вязкости, часто двухфазное — при действии слабого раздражения вязкость снижается, наступает как бы разжижение протоплазмы, а при усилении раздражения вязкость возрастает;

в) прижизненное связывание красителей (рис. 69). В норме кислые и основные красители, введенные в клетку, концентрируются во вновь возникающих гранулах и вакуолях. При раздражении эта способность изменяется, тоже зачастую двухфазно — сперва происходит усиление гранулообразования, потом его подавление. Бесцветные протоплазма и ядро прокрашиваются диффузно, в первую очередь прокрашиваются вновь образовавшиеся структуры. Хорошо прокрашиваются зерна хроматина и оболочки;

г) наблюдается сдвиг активной реакции протоплазмы в кислую сторону;

д) выход из раздраженных клеток ионов K, фосфатов, креатина, проникновение в клетку ионов натрия и хлора.

Все перечисленные изменения хорошо обратимы, если действие раздражителя не слишком продолжительно и интенсивно и не переходит в повреждение.

Состояние, характеризующееся всеми перечисленными признаками, получило название паранекроза.

Таким образом, под паранекрозом школа Насонова понимает неспецифическую реакцию протоплазмы на самые разнообразные воздействия. Термин «паранекроз» был принят для обозначения состояния, близкого к смерти, но обратимого. Этот термин должен также подчеркнуть, что между раздражением и повреждением нет принципиальной разницы.

Легко заметить большой параллелизм между теорией паранекроза и теорией парабиоза, выдвинутой в начале XX в. русским физиологом Н. Е. Введенским. Как известно, Введенский показал, что при воздействии на участок нерва любым агентом в нем последовательно развиваются совершенно определенные функциональные изменения. Возбудимость этого участка падает; в это время часть раздражающих стимулов, заданных с высокой частотой, остается без ответа — происходит трансформация ритма (трансформирующая стадия). Затем следует очень интересная парадоксальная стадия, во время которой наблюдаются обратно пропорциональные отношения между силой раздражающего стимула и ответом на него. Наконец, наступает полная потеря возбудимости и проводимости (тормозная стадия). Такое функциональное состояние, после которого возможен возврат к норме, если действующий агент будет устранен, Введенский назвал парабиозом. Описанную картину можно наблюдать не только на периферическом нерве, но и на мышцах и на других возбудимых образованиях при действии солевых растворов, наркотиков, постоянного тока, изменениях температуры, механических воздействиях и т. п. Другими словами, здесь имеет место неспецифическая реакция возбудимых образований на самые различные воздействия. Интересно отметить, что во многих случаях началу снижения возбудимости предшествует ее повышение, т. е. действие парабиотизирующего агента развивается в две фазы.

Сопоставляя данные, полученные Введенским и Насоновым и их сотрудниками, можно сделать вывод, что парабиоз и паранекроз с двух разных сторон характеризуют реакцию живого вещества на различные внешние воздействия. Парабиоз характеризует совокупность физиологических (функциональных) изменений, а паранекроз — совокупность структурных изменений живого субстрата.

Изменение белков протоплазмы. Далее вставал вопрос, какие конкретно физико-химические и биологические изменения в протоплазме лежат в основе развития паранекроза? Насонов связывал

наблюдаемые им явления с обратимой денатурацией белка. Его теория, являющаяся развитием альтерационной гипотезы Германна, получила подтверждение в работах многих авторов. Весьма интересны результаты, полученные американским исследователем Унгаром и его сотрудниками в 50-х гг. Начав работу на белковых растворах, они впоследствии перешли к работе на живых тканях и собрали четкие доказательства связи развития возбуждения с модификациями белковых молекул.

При повреждении тканей Унгар и его сотрудники наблюдали во многих случаях протеолиз. Логика, однако, подсказывала, что при физиологическом раздражении клеток должны происходить более тонкие и обратимые процессы, чем протеолиз. Трудно было также предполагать, что распад и ресинтез белков, которые удается отметить при возбуждении, непосредственно связаны с ответом возбудимого образования на каждый стимул, т. к. скорость этих процессов не достаточно велика. Скорее можно было предположить, что при возбуждении имеют место структурные изменения в белковых молекулах. Известно, что в построении белковых цепей принимают участие многие молекулы аминокислот и что белковые цепи включают ряд белковых групп ($-COOH$, $-NH_2$, $=NH$, $-OH$, $-SH$). Между этими группами возможны химические связи, в основном типа водородной. Именно благодаря наличию этих связей возникают структуры, характерные для каждого данного вида белка,— жесткие специфические конфигурации. Боковые группы оказываются при этом как бы замаскированными и малоспособными к вступлению в реакцию с другими веществами.

Различные воздействия — механические, химические, термические — приводят, как известно, к денатурации белков. Длительное время денатурация считалась необратимым процессом, поэтому ей не приписывали никакой роли в жизнедеятельности нормального организма. Однако в 1933 г. Ансон и Мирский (M. Z. Anson и A. E. Mirsky) показали, что денатурация может быть обратима. По современным представлениям денатурация — это ослабление твердой структуры белковой молекулы без разрывов пептидных связей. Считается, что при денатурации рвутся лишь связи типа водородной, и выявляются боковые группы. Такие изменения белковой молекулы можно назвать конформационными. Определять конформационные изменения в белковых растворах можно по разным признакам (например, по изменениям вязкости), но наиболее точные результаты получаются при количественном учете демаскированных боковых групп. Критерием при этом может служить изменение ультрафиолетового спектра белкового раствора.

Унгар нашел, что при возбуждении клеток происходят те же изменения, которые наблюдались на белковых растворах при денатурации. При раздражении седалищных нервов лягушки

и крысы и коры головного мозга крыс, кошек и собак удалось показать увеличение количества ионизированных боковых групп клеточных белков. По окончании раздражения число демаскированных боковых групп вновь уменьшается. Аналогичные данные были получены и другими методами, например с помощью амперметрического титрования (табл. 10).

Таблица 10

Изменение содержания SH-групп в мозгу крысы при раздражении

Время раздражения (в *мин*)	Время восстановления (в *мин*)	—SH (в *мкМ/г*)
в покое		4,56
1	—	5,08
1	1	4,75
20	—	6,55
20	20	4,17

Сходство результатов, полученных при возбуждении различных объектов, подтверждает выдвинутое Насоновым положение об единстве природы явлений возбуждения в различных клетках и тканях и о связи возбуждения с изменением клеточных белков.

Однако можно ли считать эти результаты справедливыми для всех возбудимых образований без исключения? Данные о сходстве изменений в протоплазме с изменениями в белковых растворах были получены на разных клетках в условиях, как правило, длительного и интенсивного раздражения. Поэтому правомочно поставить вопрос о том, можно ли переносить эти результаты и на работу нерва в нормальных физиологических условиях.

Нервы, по которым осуществляется передача сигналов в сложном организме позвоночных,— образования высокоспециализированные. Легко предположить, что по мере повышения лабильности [1] нерва (а она повышается при усложнении живого организма в эволюции) функция проведения в какой-то мере освобождается от прямой связи с химическими реакциями. Отсюда возникает вопрос, не является ли проведение возбуждения в нервах позвоночных животных чисто физическим процессом в отличие от возникновения возбуждения, которое очевидно связано с химическими процессами.

Широко известна теория, связывающая проведение возбуждения с местными токами, возникающими между возбужденными и покоящимися участками нерва (см. гл. 8). Эта теория имеет

[1] Лабильность — величина, характеризующая скорость протекания процессов возбуждения. Обычно лабильность определяют, как число циклов возбуждения, которое возбудимое образование способно воспроизводить в единицу времени. Термин «лабильность» был предложен Н. Е. Введенским и получил широкое распространение.

ряд экспериментальных подтверждений. Однако нерв, даже такой высоколабильный как у теплокровных животных, не является безиндукционной физической системой. Известно, что нерв, как и любая другая живая ткань, может служить проводником электрического тока и что измерение электропроводности можно производить в весьма широком диапазоне частот (см. гл. 6). Но проведение возбуждения, являющееся физиологическим процессом, может осуществляться лишь при малых частотах, не выше, чем приблизительно 1000 *имп/сек*. На химический характер процессов в нерве указывает и наличие рефрактерного периода. Правда, и ограниченная частота воспроизводимого раздражения, и наличие рефрактерного периода можно связать с возникновением возбуждения, а не с проведением, как таковым.

Для того, чтобы доказать химическую природу проведения, надо показать, во-первых, наличие химических процессов в участках нерва, отдаленных от места раздражения, и, во-вторых, показать, что химические реакции происходят при каждом нервном импульсе.

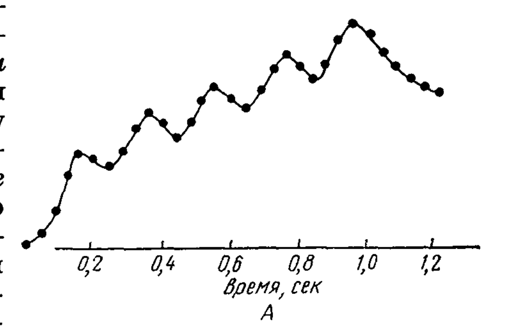
Проведение возбуждения. Прямым указанием на то, что при распространении возбуждения в нерве происходят химические процессы, может служить теплообразование в нем. В течение многих лет попытки измерить теплопродукцию нерва не имели успеха. Причина заключалась в недостаточной чувствительности аппаратуры. Только в 20-х гг. удалось показать на нерве лягушки и нерве краба, что тепло при возбуждении, действительно, выделяется. Интересно отметить, что у менее лабильного нерва краба теплообразование идет интенсивнее.

Сравнительно большое выделение тепла нервом краба позволило сделать интересные наблюдения: при каждом стимуле температура нерва повышается на $10 \cdot 10^{-6\circ}$, а затем понижается на $8 \cdot 10^{-6\circ}$. В итоге происходит повышение температуры нерва на $2 \cdot 10^{-6\circ}$ C при каждом стимуле. При ритмическом же раздражении температура нерва постепенно нарастает (рис. 70, *А*).

Хилл, которому принадлежат эти исследования, считает, что во время прохождения импульса выделение тепла происходит не во всей аксоплазме, а только у мембраны. Если это так, то теплопродукция нерва во время импульса составляет величину порядка $1 \cdot 10^{-5}$ *кал* на 1 *г* нерва или $2 \cdot 10^{-3}$ *кал* на 1 *г* активной мембраны, и близка по величине к теплопродукции мышцы. Это говорит о значительных химических изменениях. Однако доказательств того, что начальное теплообразование связано именно с мембраной, пока нет. Хилл разбирает ряд гипотез о механизме теплопродукции нерва, но сам же признает несостоятельность большинства из них. Поэтому мы не будем здесь на них останавливаться. Предпочтение Хилл отдает гипотезе, согласно которой выделение тепла связано с изменением проницаемости мембраны для ионов натрия и калия (см. гл. 8) во время той стадии возбуждения, которая связана

непосредственно с развитием потенциала действия. Изменение же проницаемости обеспечивается химическими реакциями. Затем происходит поглощение тепла.

Теплообразование происходит не только во время возбуждения, но и в покоящемся нерве. На нерве лягушки было показано, что в аэробных условиях скорость теплопродукции составляет приблизительно 130 *г·см* на 1 *г* нерва в 1 *мин*. При помещении нерва в атмосферу азота теплообразование снижается до 25—30 *г·см* на 1 *г* нерва в 1 *мин* (рис. 70, *Б*), но не прекращается. При возвращении в аэробные условия нерв выделяет избыточное количество тепла, а затем теплообразование продолжается на прежнем уровне — происходит то, что в кинетике называют переходом с избыточным отклонением—«овершут». Следовательно, можно считать, что и в покоящемся нерве метаболические процессы протекают с большой интенсивностью.



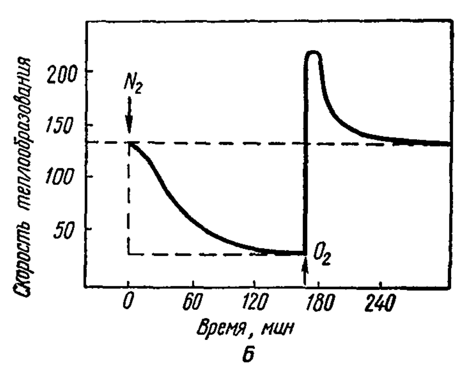


Рис. 70. Теплообразование в нерве: *А* — выделение и поглощение тепла в безмякотном нерве (по Хиллу). Расстояние между точками соответствует 40 *мсек*; *Б* — теплообразование в покоящемся нерве лягушки (по Гизе).

↓ — нерв помещен в атмосферу азота; ↑ — нерв помещен в атмосферу кислорода. Скорость теплообразования выражена в *г/см* на 1 *г* нерва в минуту

Участие химических процессов не только в возникновении возбуждения, но и в проведении его было недавно показано также работами Б. Н. Тарусова и его сотрудников. В изолированные нервы лягушки и краба вводился раствор мономера акриламида, меченный радиоактивным изотопом углерода C^{14}. Предполагалось, что при возникновении и проведении возбуждения происходит реакция, в ходе которой появляются свободные радикалы. Эти радикалы обеспечивают развитие процесса возбуждения. Некоторая же часть радикалов будет инициировать сополимеризацию находящегося в нервном волокне мономера с молекулами возбудимого субстрата. Присутствие в нерве полимера выявлялось при помощи метода гистоавторадиографии. На рис. 71 приведены гистоавторадиограммы опытного и контрольного нервов. На снимке опытного препарата

видны многочисленные черные точки — треки бета-частиц радиоактивного углерода. В контрольном препарате, не подвергавшемся раздражению, таких треков почти нет.

Препараты были изготовлены из участков нерва, отстоящих на 2,5—3 *см* от места нанесения раздражения. Это позволяет считать, что с реакцией радикального характера связано не только возникновение, но и распространение возбуждения. Остается

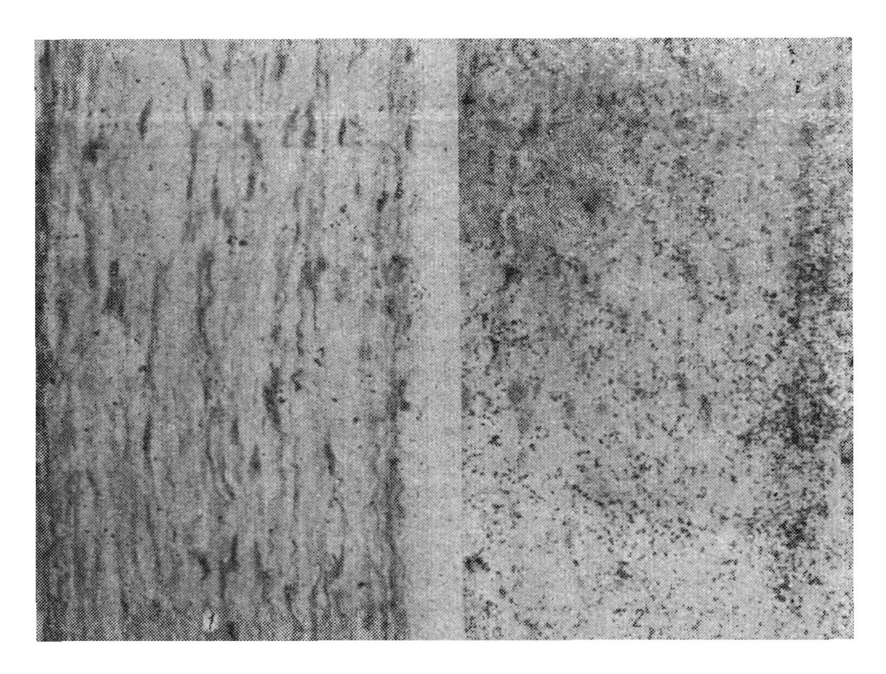


Рис. 71. Гистоавторадиограмма продольных срезов нерва конечности травяного краба (по Лимаренко и Козлову): *1* — контроль; *2* — опыт (нерв раздражался в течение 10 *мин* с частотой 150 *имп/сек*).

Увеличение 600. На авторадиограмме подопытного нерва видны треки β-частиц радиоактивного углерода

открытым вопрос, обеспечивает эта реакция развитие возбуждения или восстановление исходного состояния возбудимого субстрата после осуществления возбуждения, и какие химические вещества участвуют в этой реакции. Интересно отметить, что в условиях снижения лабильности нерва, например при охлаждении, радикалообразование уменьшается.

С какими химическими процессами можно, хотя бы предположительно, связать теплообразование в нерве? То сравнительно немногое, что известно о метаболизме нервной ткани, относится в большей степени к самим нервным клеткам, чем к волокнам.

Установлено, что дыхательный коэффициент покоящихся клеток головного мозга равен 1,0 (дыхательный коэффициент аксона равен приблизительно 0,8). Это указывает на интенсивное протекание окислительных процессов. В аэробных условиях идет, главным образом, окисление глюкозы, причем потребляется очень большое количество кислорода. Окисление углеводов в свою очередь связано с процессами окислительного фосфорилирования. Установлено также, что в нервных клетках расходуются белки и жиры. На это указывает появление в них креатина, аммиака и фосфатов. В анаэробных условиях нервные клетки черпают энергию из запасов гликогена, выделяя при этом молочную кислоту.

При возбуждении интенсивность обмена в нервных клетках повышается. Уровень содержания АТФ, с которой связано использование свободной энергии, поддерживается в возбужденных нервных клетках постоянно. Однако распад и восстановление фосфокреатина происходит в возбужденном нерве быстрее, чем в покоящемся. Роль макроэргических соединений в процессе возбуждения может быть проиллюстрирована интересным наблюдением: в бескислородной среде нерв краба, имеющий большой запас гликогена, сохраняет проводимость в течение пяти часов; нерв млекопитающего, в котором содержится меньше гликогена, теряет проводимость за 20 *мин*.

Однако все эти сведения носят слишком общий характер и не позволяют еще построить сколько-нибудь полную картину химических реакций, протекающих при возбуждении. Мы не знаем также ничего достоверного о том, какова в развитии возбуждения роль высокомолекулярных, например липопротеиновых комплексов. Известно лишь, что ферментативные системы органоидов имеют большое значение для метаболизма нервных клеток. В нервных клетках имеются ферменты, связанные с аэробным и анаэробным обменом и окислительным фосфорилированием. Так процессы окислительного фосфорилирования связаны с митохондриями, а биосинтез белков — с микросомами. Однако сказать, в каком порядке и каким образом происходит последовательная смена метаболических процессов при возбуждении, пока трудно.

Многие авторы приписывают большую роль в развитии возбуждения ацетилхолину. Исследования Нахманзона (D. Nachmansohn) дали большой материал для понимания процессов, обеспечивающих передачу возбуждения в синапсах. Согласно его исследованиям, в период покоя происходит синтез ацетилхолина. Под влиянием фермента холинацетилазы происходит ацетилирование холина. В этом процессе принимает участие АТФ и коэнзим А. Пока на клетку не нанесено раздражение, ацетилхолин находится в связанном состоянии. При раздражении он высвобождается в малых количествах, всего 10^{-16} *моль*

на один импульс при раздражении одного нейрона. Механизм этого высвобождения не выяснен. Не выяснено также, какое звено стоит между высвобождением ацетилхолина и следующей за этим изменением проницаемости клеточной оболочки. Есть предположение, что ацетилхолин меняет диаметр пор мембраны (Экклс — J. C. Eccles) или что он меняет конфигурацию белковых молекул, входящих в состав клеточной оболочки (Нахманзон). Затем ацетилхолин распадается под воздействием фермента ацетилхолинэстеразы. Наличие двух ферментов — холинацетилазы и ацетилхолинэстеразы — обеспечивает быструю смену синтеза и распада ацетилхолина, что необходимо для работы высоколабильных возбудимых образований.

Нахманзон отводит ацетилхолину ведущую роль и в распространении возбуждения. Он предполагает, что ферментативный распад ацетилхолина дает начало реакции, которая распространяется автокаталитическим способом по оболочке нерва, богатой макроэргическими соединениями. Осевой цилиндр, согласно этой гипотезе, непосредственно в проведении возбуждения не участвует. Эти взгляды Нахманзона нуждаются еще в экспериментальном подтверждении. В настоящее время можно считать, что роль ацетилхолина точно показана применительно, в первую очередь, к синаптической передаче возбуждения.

Коллоидная теория. Специального рассмотрения заслуживает так называемая коллоидная теория возбуждения, выдвинутая американским ученым Гейльбруном. Согласно его гипотезе, основой возбуждения является реакция поверхностной преципитации, которой клетка отвечает на любой стимул. Как известно, структура протоплазмы у поверхности клетки более ригидна и плотна, чем в центре клетки. Эта ригидность вызвана наличием ионов кальция, связанных с белками. При нанесении раздражения кальций освобождается и, диффундируя внутрь клетки, дает начало коагуляции протоплазмы. Наблюдения, подтверждающие эту точку зрения, были сделаны Гейльбруном на растительных клетках, на нервах и на мышцах при механическом и электрическом раздражениях. Он предположил, что при коагуляции белковые цепочки как бы «складываются», причем обнажаются группы, ранее не участвующие в реакции. Коллоидная теория носит пока еще описательный характер и требует многих уточнений. Однако широко известные данные о изменении вязкости протоплазмы при повреждении и возбуждении и новейшие данные о том, что в отсутствие кальция передача и распространение возбуждения невозможны, позволяют считать эту теорию весьма перспективной.

Ценность коллоидной теории Гейльбруна заключается еще и в том, что он рассматривает процесс возбуждения с общебиологических позиций, подчеркивая участие в этом процессе всей клетки в целом.

Таковы, в основном, на сегодняшний день наши, пока еще очень неполные сведения о химических и физико-химических процессах при возбуждении. Предстоит еще очень многое уточнить и, в первую очередь, связать данные об изменениях в протоплазме с многочисленными и очень точными сведениями о движении ионов, являющимся одним из важнейших компонентов развития возбуждения.

При покое возбудимые образования находятся в стационарном состоянии. Для нервов, которые не совершают механическую работу, поддержание стационарного состояния сводится, в первую очередь, к поддержанию неравномерного распределения ионов между клеткой и средой. При возбуждении распределение ионов приближается к такому, какое наблюдается при термодинамическом равновесии, однако термодинамического равновесия живое возбудимое образование никогда не достигает. Очевидно, при длительном и интенсивном раздражении устанавливается новое стационарное состояние на новом уровне, и это позволяет возбудимому образованию работать в различных условиях в течение долгого времени. Подтверждением этому положению может служить тот факт, что, как было отмечено выше, уровень содержания АТФ в покоящихся и в возбужденных нервных клетках поддерживается постоянным, хотя скорость процессов распада и ресинтеза изменяется.

Возможно, что именно с позиций термодинамики найдут свое объяснение такие феномены, как усвоение ритма раздражения, изменение уровня лабильности в зависимости от условий существования и другие явления, важные для нормальной работы живого организма.

ГЛАВА VIII

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Во второй половине XVIII в. после исследований Гальвани (L. Galvani) стало известно, что биологические системы способны генерировать электрическую энергию. Однако только за последние 20—25 лет, благодаря большому числу работ, проведенных на клеточном уровне с помощью новейших методов исследования, получены количественные данные, позволившие приблизиться к познанию природы биоэлектрических потенциалов.

Трудности исследования биопотенциалов вызваны малыми размерами изучаемых объектов и скоростью изменения этих явлений, в частности в нервах и мышцах. Частично преодолеть эти трудности оказалось возможным только благодаря быстрому развитию электроники и других технических средств исследования. Одновременно с появлением возможности детального количественного исследования биоэлектрических явлений, выявляется все больше противоречий между различными теориями, созданными ранее — преимущественно на основе качественных данных. Необходимость разрешения этих противоречий привлекает внимание все бóльшего числа исследователей к этим проблемам.

Так как в биологии еще в бóльшей степени, чем в других разделах науки, практически невозможно исследовать один изолированный процесс, к изучению биоэлектрических явлений приходится привлекать все большее число методов, данных, экспериментальных приемов и понятий из смежных отраслей — биохимии, физиологии, цитологии, физической химии и электрохимии.

Само название «биоэлектрические потенциалы» — неудачное, но укоренившееся в литературе выражение. Исходя из физического определения понятия «электрический потенциал», мы можем говорить лишь об изучении разности потенциалов между двумя точками. Такие четко выраженные разности потенциалов имеют место между содержимым живой клетки и окружающей ее средой, между возбужденным и невозбужденным участками одной и той же клетки, между различными участками одного и того же органа, находящимися в различных физиологических состояниях и т. д. Во всех случаях причиной возникновения разности электрических потенциалов является наличие двойного электрического слоя между рассматриваемыми точками.

Причина возникновения э.д.с., т. е. разности потенциалов в живых системах, несомненно кроется в наличии определенных физико-химических градиентов. Такие градиенты могут существовать между отдельными тканями, между окружающей клетку жидкостью, например лимфой, и клеточным содержимым; между отдельными клеточными органоидами, например между цитоплазмой и кариоплазмой и т. д.

В одних случаях эти градиенты постоянно поддерживаются какими-то звеньями обмена веществ, и тогда мы встречаем постоянные разности потенциалов, характерные для живых систем, находящихся в стационарном состоянии. В других случаях какая-то разность потенциалов быстро возникает и вновь исчезает. В этих случаях мы обычно имеем дело с переходными процессами, т. е. переходами от одного стационарного состояния к другому.

Каких величин могут достигать разности потенциалов в биологических системах, можно видеть из данных табл. 11.

Таблица 11

Примерные средние величины потенциалов покоя клеток различных тканей, измеренные с помощью внутриклеточных микроэлектродов, в стандартных физиологических средах, используемых при работе с данными объектами

Объект	Среда	Величина ПП, *мв*
Поперечно-полосатое мышечное волокно бесхвостых амфибий	Раствор Рингера, лимфа	90—98
Гигантский аксон головоногих моллюсков	Искусственная морская вода	51—60
Нейтроны брюхоногих моллюсков:	Гемолимфа	
а) микроэлектрод в цитоплазме		~30
б) микроэлектрод в ядре		~70
Клетки слюнной железы личинки дрозофилы:	Раствор Рингера для холоднокровных	
а) микроэлектрод в цитоплазме		~20
б) микроэлектрод в ядре		~33
Водоросль нителла	Искусственная прудовая вода	150—180

Для того, чтобы в дальнейшем ознакомиться с экспериментальными данными, относящимися к механизму поддержания биоэлектрических потенциалов, нужно вспомнить, какие физико-химическое явления лежат в основе возникновения разностей потенциалов, каких величин они достигают и в каких условиях их можно измерять адекватно.

ЭЛЕКТРОДНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Если одна из двух граничащих друг с другом фаз содержит ионы или полярные молекулы, то на границе раздела возникает двойной электрический слой. Характерным примером в этом отношении является граница: металл — раствор электролита.

Пластинка металла погружена в раствор какой-либо его соли, например пластинка серебра в растворе $AgNO_3$. Если химический потенциал ионов серебра в металле меньше, чем в растворе, то для восстановления равновесия часть ионов из раствора перейдет в металл, что приведет к появлению на нем положительного заряда. Этот заряд будет препятствовать дальнейшему переходу ионов Ag^+ из раствора на металл и создаст вблизи электрода слой притянутых к нему анионов NO_3^-. Возникает электрохимическое равновесие, при котором химические потенциалы ионов в металле и в растворе различаются на величину разности потенциалов образующегося при этом двойного электрического слоя.

$$z_i F\psi = \mu_{i(р-р)} - \mu_{i(эл)}, \qquad (8.1)$$

где $\mu_{i(р-р)}$ — химический потенциал i-го иона, в растворе
$\mu_{i(эл)}$ — химический потенциал i-го иона в электроде
z_i — заряд иона,
F — число Фарадея,
ψ — потенциал электрода по отношению к раствору.

Наоборот, если химический потенциал ионов Ag^+ в металле будет больше, чем в растворе, то при установлении равновесия ионы Ag^+ будут переходить из металла в раствор. Металл при этом получит отрицательный заряд и будет притягивать катионы серебра. Возможен также случай, когда

$$\mu_{i(р-р)} = \mu_{i(M)} \qquad (8.2)$$

и, следовательно, переход ионов не будет иметь места. Заряд электрода в этом случае равен нулю. Раствор, который соответствует условию равенства химических потенциалов, обычно называют нулевым раствором.

Установление электрохимического равновесия между раствором, исходно не содержавшем ионы данного металла, наступает при достижении различной разности потенциалов между раствором и электродом и при различном количестве ионов, перешедших в раствор, причем эти величины характерны для каждого металла. Наименьшую величину эти параметры имеют у благородных металлов, и они быстро возрастают в ряду Вольта:
Pt, Au, Ag, Hg, Cu, Ni, Zn, Mn...

При погружении в раствор двух различных металлических электродов металл, у которого электрохимическое равновесие между электродом и раствором устанавливается при бо́льших

значениях разностей потенциалов между раствором и электродом, принимает более высокий отрицательный потенциал.

Нернст вычислил разность потенциалов на границе металл — раствор, исходя из осмотической работы, которую необходимо совершить при увеличении концентрации раствора на 1 грамм-моль растворенного вещества, т. е. на изменение осмотического давления P_1 до P_2:

$$A = RT \ln \frac{P_2}{P_1}, \qquad (8.3)$$

где R — газовая константа — 8,31 *дж*,

T — температура в градусах Кельвина.

Такое изменение концентрации может быть произведено при пропускании через раствор 96 500 кулонов (число Фарадея — F). В зависимости от направления тока, произойдет переход в раствор или осаждение на электроде 1 грамм-эквивалента ионов металла. Если через E обозначить изменение электродного потенциала, то электрическая работа, затрачиваемая на изменение ионной концентрации раствора, равняется EF. Так как оба обратимых процесса — осмотический и электрохимический — приводят к одному и тому же результату, то и работа, совершаемая в каждом из них должна быть одинаковой. Поэтому $A = EF$ и

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_2}{P_1}. \qquad (8.4)$$

Осмотическое давление можно заменить пропорциональной ему концентрацией. Тогда

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{(\text{эл})}}{C_{(\text{р-р})}}.$$

Если мы имеем дело с многовалентным ионом, то формула для электродного потенциала примет такой вид:

$$E = \frac{RT}{Fz} \ln \frac{C_{(\text{эл})}}{C_{(\text{р-р})}} \text{ вольт}, \qquad (8.5)$$

где z — валентность металла.

Для того чтобы измерить разность потенциалов, нужно, конечно, сравнивать потенциал исследуемого электрода с известным нам потенциалом какого-либо другого электрода. В качестве стандартных электродов сравнения принято пользоваться нормальным водородным электродом или любым другим, потенциал которого в данных условиях остается постоянным по отношению к нормальному водородному.

Концентрационные цепи. Разность потенциалов, очевидно, возникает еще и в том случае, если два электрода из одного и того же металла опустить в растворы соли этого металла разной концентрации (C_1 и C_2).

Разность потенциалов E, определяющая э.д.с. такой системы, будет:

$$E = E_{C_1} - E_{C_2} = \frac{RT}{Fz} \ln \frac{C_{(эл)}}{C_1} - \frac{RT}{Fz} \ln \frac{C_{(эл)}}{C_2} = \frac{RT}{Fz} \ln \frac{C_2}{C_1} \text{ вольт.} \quad (8.6)$$

Таким образом, э.д.с. такой цепи, называемой концентрационной, определяется исключительно отношениями активных концентраций ионов металла в обоих контактирующих с электродами растворах.

Активная концентрация обычно отличается от абсолютной концентрации раствора. Для учета этого вводится понятие о коэффициенте активности — т. е. коэффициенте, учитывающем все факторы, приводящие к тому, что не все ионы раствора могут взаимодействовать с электродом. Активную концентрацию, равную произведению концентрации на коэффициент активности (f), называют часто просто активностью и обозначают «a», т. е. $a = fC$. При $+20°$ С (газовая константа равна 8,31 джоуля, число Фарадея $= 96\,500$ кулонов, а $T = 293°$) и переходе к десятичным логарифмам множитель $\frac{RT}{F}$ окажется равным 0,058. Тогда в концентрационной цепи, в которую включены отличающиеся по активностям в 10 раз растворы одновалентных катионов и обратимые по этим катионам электроды, разность потенциалов будет равна 58 милливольт при $+20°$ С. Применение концентрационных цепей дает возможность наиболее точно электрометрически определять ионные концентрации, если есть возможность создать обратимые по данному элементу электроды. Такие практически обратимые электроды могут быть построены и для ряда других элементов — неметаллов, например для ионов хлора (насыщенные хлорсеребряные электроды), обратимыми следует считать и стеклянные электроды для определения концентрации водородных ионов или для определения активности натрия или калия. Важно, чтобы при переходе иона в раствор или при осаждении иона на электроде концентрация этого иона на поверхности электрода не менялась.

Окислительно-восстановительные потенциалы. Рассмотрим еще один вид электродных потенциалов.

В организме происходит ряд окислительно-восстановительных реакций. Окисление — отнятие электрона, а восстановление — связывание электрона. При соответствующих условиях такие реакции могут служить источниками возникновения э.д.с.

Если два электрода из инертного металла, т. е. металла, стоящего в самом начале ряда Вольта, например из платины, погрузить в соприкасающиеся растворы, содержащие $FeCl_2$ и $FeCl_3$, причем концентрация одной из этих солей в одном из растворов больше, чем в другом, то между этими электродами потечет электрический ток. Реакция, обусловливающая появление э.д.с.,

следующая:

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftarrows Fe^{2+}.$$

Чем больше ионов трехвалентного железа по сравнению с ионами двухвалентного железа будет в растворе, тем больше стремление реакции сместиться вправо. Однако для этого необходим донатор свободных электронов. При избытке двухвалентного железа в растворе реакция будет стремиться сместиться влево, но для этого должен присутствовать акцептор для избыточных электронов. Если в таких условиях замкнуть цепь между двумя такими растворами через металлические электроды, то ток во внешней цепи потечет от первого раствора (где имеется избыток трехвалентного железа) ко второму (где избыток двухвалентного железа), так как электрод в первом растворе стал положительным, а во втором растворе он принял избыток отрицательных зарядов. Разность потенциалов ΔE между двумя электродами в такой окислительно-восстановительной цепи будет равна:

$$\Delta E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_1^{3+}}{C_1^{2+}} - \frac{RT}{F} \ln \frac{C_2^{3+}}{C_2^{2+}}, \text{ или}$$

$$\frac{RT}{F} \left(\ln \frac{C_1^{3+}}{C_1^{2+}} - \ln \frac{C_2^{3+}}{C_2^{2+}} \right). \quad (8.7)$$

Окислительно-восстановительный (или редокс) потенциал на каждом из электродов можно охарактеризовать формулой

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C^{3+}}{C^{2+}} + C, \text{ или для } 20^\circ \text{ C } 0{,}058 \lg \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} + C, \quad (8.8)$$

где константа C — величина, характерная для каждой редокс-системы и соответствует ее редокспотенциалу при $\frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} = 1$; lg этого выражения равен 0.

Все до сих пор рассмотренные случаи возникновения разностей потенциалов характеризуются общим условием: *необходимо наличие электродов, которые служат акцепторами, или донаторами электронов*. Поэтому их объединяют условно под общим понятием: «электродные потенциалы» (Д. Л. Рубинштейн). Практическое различие состоит в том, что для измерения концентрационных потенциалов необходимо наличие обратимых по исследуемому иону электродов, в то время как в окислительно-восстановительных цепях применяются металлические электроды из инертного металла, о которых можно сказать, что они «обратимы по электронам».

ИОННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Существует также иная группа цепей, где основная причина возникновения э.д.с. заключается не в том, что происходит новообразование ионов или их нейтрализация на электродах,

а за счет того, что имеет место неравномерное распределение анионов и катионов по две стороны какой-то границы раздела, т. е. где двойные электрические слои приурочены не к границе электрода со средой, а к самой среде.

До сих пор, излагая концентрационные цепи, мы умышленно обходили вопрос о том, как устанавливается контакт между двумя растворами разной концентрации. Ведь при отсутствии контакта между ними цепь была бы разорвана и никакой разности потенциалов обнаружить бы не удалось. Если два таких раствора привести в контакт между собой непосредственно, то в результате диффузии различия в концентрациях очень быстро уравнялись бы. К тому же подвижность анионов и катионов большинства солей в воде неодинакова. Рассмотрим модель, в которой в соприкосновение приводятся два раствора соляной кислоты. Подвижность водородного иона равна 315, хлора же 65,4. При диффузии ион водорода в первые же мгновения опередит ионы хлора. Положительные и отрицательные ионы распределятся неравномерно по отношению к какой-то условной границе раздела. Из-за этого возникает разность потенциалов, которая быстро приведет к уравнению скоростей диффузии ионов. Создавшаяся разность потенциалов замедлит скорость диффузии ионов H^+ и увеличит скорость диффузии ионов Cl^-. В описанных условиях такая диффузионная разность потенциалов не может существовать долго, а только пока не установится равномерное распределение ионов по всему объему. Величина же этой разности потенциалов будет, помимо разности в подвижностях ионов, зависеть еще и от отношения концентраций исходных растворов. Величина диффузионной разности потенциалов будет определяться следующим уравнением:

$$E = \frac{RT}{Fz}\,\frac{U^+ - V^-}{U^+ + V^-}\ln\frac{C_2}{C_1},$$

или

$$\frac{0,058}{z}\,\frac{U^+ - V^-}{U^+ + V^-}\lg\frac{C_2}{C_1}\ \text{вольт при } 17^\circ\,\text{C}, \qquad (8.9)$$

где U^+ и V^- — подвижности катиона и аниона соответственно. Естественно, что при изучении любых цепей мы измеряем сумму всех скачков потенциала между точками отсчета. Для вычленения диффузионной разности потенциалов мы должны воспользоваться электродами, устроенными таким образом, чтобы их потенциал был постоянным.

На деле это металлические (обратимые) электроды, находящиеся в постоянном контакте с насыщенным раствором соли того же металла, который в свою очередь соединяется с исследуемым посредством солевого мостика — трубочки, наполненной раствором соли, подвижность ионов которой в данном растворителе одинакова. Тогда жидкостной контакт на границе полу-

элемент — исследуемый раствор можно считать свободным от скачка потенциала. Используя два одинаковых полуэлемента, включаемых навстречу друг другу в цепь, мы сможем измерить все разности потенциалов, возникающие между точками отсчета.

Важно запомнить, что направление тока в диффузионных цепях противоположно его направлению в концентрационной цепи.

Задача экспериментатора, интересующегося величиной концентрационной разности потенциалов, состоит в том, чтобы свести до минимума диффузионную разность потенциалов, которая неминуемо возникнет при установлении непосредственного контакта двух растворов. Для этого оба исследуемых раствора соединяют тонким капилляром, наполненным насыщенным раствором хлористого калия — солевым мостиком. Подвижности ионов калия и хлора в воде практически равны. Чтобы уменьшить диффузию хлористого калия из капилляра, последний или же делают очень тонким, или же наполняют 3%-ным гелем агар-агара, приготовленном на растворе KCl.

С другой стороны, разность подвижностей противоположно заряженных ионов может быть увеличена искусственно, например, созданием какой-то перегородки из пористой керамики, через которую ионы будут диффундировать с различной скоростью.

РАВНОВЕСИЕ ДОННАНА

Когда две сосуществующие фазы изолированы друг от друга таким образом, что один или несколько ионных компонентов не могут перейти из одной фазы в другую, устанавливается особое равновесие, называемое «равновесием Доннана» (F. Donnan). Такое разграничение фаз может быть вызвано наличием мембраны, проницаемой для растворителя и малых ионов, но непроницаемой для ионов с размерами коллоидных частиц. Часто поэтому такого рода равновесие называют мембранным. Не всегда, однако, необходимо присутствие мембраны. В геле или смоле, где структурный компонент заряжен, и даже в отстое суспензии типа глин, т. е. всегда, когда соединение диссоциирует на очень крупные и мелкие ионы, имеют место равновесия доннановского типа.

Равновесие Доннана имеет три важных аспекта:

1) неравномерное распределение ионов;

2) осмотическое давление;

3) разность потенциалов между фазами.

Условия равновесия Доннана удобно описываются посредством электрохимических потенциалов (η), внедренных Гуггенгеймом.

$$\eta_i = \mu_i + z_i F \psi, \qquad (8.10)$$

где μ_i — химический потенциал ионов типа i, z_i — их валентность (включая знак), F — число Фарадея и ψ электрический потенциал фазы, к которой относятся η_i и μ_i.

При равновесии температура и электрохимические потенциалы всех диффундирующих компонентов равны в обеих фазах (но давления могут различаться и, как правило, различаются).

$$\eta_{i_{\text{в}}} = \eta_{i_{\text{н}}}, \tag{8.11}$$

где две фазы, соответственно помечаются индексами в — внутренняя, и н — наружная по отношению к мембране. Для идеальных растворов эти уравнения могут быть представлены в следующем виде:

$$\mu_{i_c} + P_{\text{в}} v_i + RT \ln x_{i_{\text{в}}} + zF\psi_{\text{в}} = \\ = \mu_{i_c} + P_{\text{в}} v_i + RT \ln x_{i_{\text{н}}} + z_i F\psi_{\text{н}}, \tag{8.12}$$

где предполагается, что парциальный молярный объем Δq_i всех компонентов не зависит от давления P, μ_{i_c} — химический потенциал в стандартных условиях, а x_i — молярная доля иона i.

Предыдущее уравнение, при учете условия об электронейтральности каждой из фаз

$$\Sigma z_i x_{i_{\text{в}}} = 0 = \Sigma z_i x_{i_{\text{н}}}, \tag{8.13}$$

полностью определяет состояние системы в равновесии. Ограничиваясь теперь рассмотрением полностью диссоциированной одновалентной соли, одного недиффундирующего иона валентности z и растворителя w (воды), мы получим пять уравнений:

$$(P_{\text{в}} - P_{\text{н}}) v^+ + F(\psi_{\text{в}} - \psi_{\text{н}}) = RT \ln \frac{x_{\text{н}}^+}{x_{\text{в}}^+}, \tag{8.14а}$$

$$(P_{\text{в}} - P_{\text{н}}) v^- - F(\psi_{\text{в}} - \psi_{\text{н}}) = RT \ln \frac{x_{\text{н}}^-}{x_{\text{в}}^-}, \tag{8.14б}$$

$$(P_{\text{в}} - P_{\text{н}}) v_w = RT \ln \frac{x_{w_{\text{н}}}}{x_{w_{\text{в}}}}, \tag{8.14в}$$

$$x_{\text{в}}^+ - x_{\text{в}}^- + z x_{z_{\text{в}}} = 0, \tag{8.14г}$$

$$x_{\text{н}}^+ = x_{\text{н}}^- = x, \tag{8.14д}$$

где катионы обозначены +, анионы —, недиффундирующий ион — z, вода — w.

Распределение ионов определяется объединением первых двух уравнений:

$$\ln \frac{x_{\text{н}}^+ x_{\text{н}}^-}{x_{\text{в}}^+ x_{\text{в}}^-} = \frac{(P_{\text{в}} - P_{\text{н}})(v^+ + v^-)}{RT}. \tag{8.15}$$

Когда концентрация недиффундирующих ионов не очень велика, разность давлений $P_{\text{в}} - P_{\text{н}}$ так мала, что правой частью уравнения можно пренебречь.

Распределение ионов тогда может быть рассчитано из уравнений (8.14 г, д) и (8.16)

$$x_{\text{в}}^{+}\cdot x_{\text{в}}^{-}=x_{\text{н}}^{+}\cdot x_{\text{н}}^{-}. \tag{8.16}$$

Выражая в том же приближении результат в молярных концентрациях — C — вместо мольных долей, и помня, что мы рассматриваем одно-одновалентный электролит, получим:

$$C_{\text{в}}^{+}\cdot C_{\text{в}}^{-}=(C_{\text{н}})^{2}, \tag{8.17}$$

$$C_{\text{в}}^{+}-C_{\text{в}}^{-}+ZC_{Z_{\text{в}}}=0. \tag{8.18}$$

Здесь $C_{\text{н}}$ — концентрация соли снаружи.

Осмотическое давление определяется из уравнения (8.14в); легко показать, что оно для рассматриваемой модели практически описывается уравнением Вант-Гоффа

$$P_{\text{в}}-P_{\text{н}}\approx RT\,(C_{\text{в}}^{+}+C_{\text{в}}^{-}-2C_{\text{н}}+C_{Z_{\text{в}}}). \tag{8.19}$$

Разность потенциалов между фазами определяется из уравнения (8.14а) или (8.14б), если пренебречь малыми членами Pv:

$$\psi_{\text{в}}-\psi_{\text{н}}=\frac{RT}{F}\ln\frac{C_{\text{н}}^{+}}{C_{\text{в}}^{+}}=\frac{RT}{F}\ln\frac{C_{\text{в}}^{-}}{C_{\text{н}}^{-}}. \tag{8.20}$$

Все это относится к идеальным растворам одно-одновалентных электролитов и одного недиффундирующего иона по внутреннюю сторону мембраны.

Если же в системе участвует несколько диффундирующих пар ионов, то на основании уравнения (8.16) для распределения любого из них можно написать:

$$\left(\frac{C_{\text{н}}^{+}}{C_{\text{в}}^{+}}\right)^{\frac{1}{Z^{+}}}=\left(\frac{C_{\text{в}}^{-}}{C_{\text{н}}^{-}}\right)^{\frac{1}{Z^{-}}}=\ldots \tag{8.16а}$$

а для разности потенциалов между фазами:

$$\psi_{\text{в}}-\psi_{\text{н}}=\frac{RT}{Fz^{+}}\ln\frac{C_{\text{н}}^{+}}{C_{\text{в}}^{+}}=\frac{RT}{Fz^{-}}\ln\frac{C_{\text{в}}^{-}}{C_{\text{н}}^{-}}=\ldots \tag{8.20а}$$

Следует делать четкое разграничение между распределением мелких ионов и осмотическим давлением, с одной стороны, и потенциалом Доннана, с другой.

Первые два свойства равновесной системы хорошо определены с термодинамической точки зрения. Что же касается доннановского потенциала, то он может быть измерен только путем введения солевых мостиков в оба раствора, а это приводит к наложению необратимых процессов на равновесную систему. Если же

вместо солевых мостиков в оба раствора вставить по одинаковому обратимому электроду, разность потенциалов окажется нулевой, так как в целом система будет находиться в равновесии.

Потенциал Доннана был определен как разность потенциалов между двумя растворами. Предположение, что он равен разности потенциалов между двумя солевыми мостиками, подразумевает, что жидкостные контакты на границах неполяризующийся полуэлемент — фаза, и в этих условиях свободны от потенциала, как это принято считать, когда имеют дело с разбавленными растворами электролитов, или, по крайней мере, что они равной величины. Однако фазы по обе стороны мембраны неодинаковы уже по определению, и, поскольку независимых методов определения разности потенциалов между фазами различного состава не существует, предположение об отсутствии скачков потенциала на контакте мостиков с фазами нельзя проверить. Даже если допущение об отсутствии контактных потенциалов оправдано для разбавленных растворов простых электролитов, его применение к суспензиям, содержащим сильно заряженные частицы коллоидных размеров, может вызвать сомнение.

Единственная возможность получения измеряемых величин, наиболее близко соответствующих идеальным значениям э. д. с. Доннана, это до предела ограничивать диффузию электролита из солевого мостика, то есть использовать в работе солевой мостик микроразмеров и приборы, работающие в электрометрическом режиме. Тогда допустимо считать, что созданы условия, при которых равновесная система, каковой является доннановская, переводится в стационарную, в которой распределение ионов практически не нарушается, а измеряемая разность потенциалов, соответственно, практически равна по величине доннановской э. д. с.

Далее в данной главе для удобства изложения сначала будут рассматриваться постоянные или медленно изменяющиеся биоэлектрические разности потенциалов, т. е. такие, в основе которых лежат более или менее стационарные процессы, а затем будут рассмотрены быстрее изменяющиеся разности потенциалов, в основе которых лежат процессы перехода из одного стационарного состояния в другое.

ПОСТОЯННЫЕ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ РАЗНОСТИ ПОТЕНЦИАЛОВ

Наличие разности потенциалов между различными частями одной системы, вероятно, одна из наиболее характерных черт всего живого. С этим приходится считаться, рассматривая проблему на различных уровнях структурной организации — молекулярном и ионном, на субклеточном уровне (ядра, митохондрии, хлоропласты и т. д.) и на клеточном уровне, а также при анализе взаимодействия отдельных клеток, тканей и органов.

Постоянные разности потенциалов были найдены между содержимым любых живых клеток животного и растительного происхождения и окружающей их средой, через стенки органов пищеварительного тракта, через кожу амфибий, между различными участками одного и того же органа чувств, почечного канальца и в ряде других случаев.

Общие принципы. Клетку, окруженную внеклеточной биологической средой или искусственным солевым раствором, приходится рассматривать как двух- или многокомпонентную систему, состоящую из различных смесей растворов — электролитов, полиэлектролитов и полиэлектролитных гелей. Между крайними фазами этой системы могут возникать устойчивые разности электрических потенциалов, если существует фаза раздела, на которой и имеет место то падение потенциала, которое измеряется. Часто такую фазу раздела называют мембраной, хотя следует помнить, что такая мембрана может иметь очень сложную морфологическую структуру, сложный биохимический состав и различные ионообменные свойства и быть на деле многокомпонентным образованием, из состава которого, в свою очередь, можно было бы выделить еще несколько специфических объемов и фаз.

Основной причиной возникновения разности потенциалов через фазу раздела следует считать несимметричное распределение одного или нескольких видов ионов между крайними фазами. Если это относится только к одному виду ионов, то в связи с тем, что такая система по законам термодинамики должна придти к равновесию, в каждой из фаз должна установиться электронейтральность. Происходит это путем перераспределения остальных ионов, способных свободно проникать через фазу раздела.

Тенденция этих ионов восстановить равномерное распределение каждого из видов ионов по всей системе найдет свое выражение в разности потенциалов, приуроченной к фазе раздела. Эта разность потенциалов будет, как было изложено выше, функцией степени неравномерности распределения ионов, способных диффундировать через фазу раздела.

Уравнение, выведенное Нернстом (8.6), применимо только к системам, в которых ионы распределяются пассивно, т. е. в этом случае не имеют место какие-либо процессы, активно перемещающие эти ионы против их электрохимических градиентов.

Возможной причиной разности потенциалов через мембрану может быть, однако, и наличие активного переноса одного из видов ионов через фазу раздела. Такое перемещение ионов (зарядов) представляло бы собой электрический ток, направление которого соответствовало бы току положительно заряженных ионов. В этом случае также имело бы место разделение зарядов, т. е. образование двойного электрического слоя. Такую систему применительно к клетке можно было бы трактовать как химико-электрический преобразователь, питаемый энергией, освобождающейся в ходе

обмена веществ. Пассивное распределение остальных ионов, в этом случае, будет соответствовать тому же уравнению Нернста.

Третьей возможной причиной возникновения разности потенциалов через мембрану клетки могло бы быть наличие в ней системы, которую можно было бы охарактеризовать как электрохимический преобразователь. Речь могла бы идти, например, об окислительно-восстановительной системе. Если в такой сопряженной системе осуществляется перенос электронов через мембрану, то через фазу раздела потечет электрический ток, переносчиком которого были бы электроны. Результатом этого было бы наличие разности потенциалов через фазу раздела. Ионы, как и в предыдущем варианте, распределялись бы пассивно по обе стороны мембраны согласно тому же уравнению Нернста.

В первом случае первичным процессом следует считать несимметрическое распределение ионов, в остальных — возникновение разности потенциалов через фазу раздела в результате непрерывно протекающих процессов активного переноса зарядов через фазу раздела.

ВОЗМОЖНЫЕ ОБЩИЕ ПРИЧИНЫ НЕСИММЕТРИЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ

Несимметричное распределение ионов между клеткой и средой может иметь место из-за непроницаемости фазы раздела для одного или нескольких видов ионов (доннановская система). Однако неравномерное распределение ионов между клеткой и средой может зависеть от свойств самой протоплазмы.

Действительно, для установления несимметричного распределения веществ между клеткой и средой мембрана не нужна. Соединения, составляющие основу протоплазмы, могли бы образовать недиссоциирующие комплексы с ионами щелочных металлов, содержащихся во внешней среде. Однако в этом случае разность потенциалов между содержимым клетки и внешней средой, измеряемая, например, с помощью микроэлектродов, могла бы возникать только после механического разрушения внутриклеточных структур электродом. Разность потенциалов тогда могла бы возникать только либо благодаря возникновению диффузии вновь образовавшихся при распаде комплекса ионов, обладающих разными подвижностями (так называемая диффузионная разность потенциалов), либо в результате того, что объем, содержащий продукты распада комплекса, отделен от внешнего раствора прослойкой неразрушенной протоплазмы, которая в данном случае играла бы роль фазы раздела (т. е. фазовая разность потенциалов). В обоих случаях или при сочетании обоих явлений эта разность потенциалов не была бы преформирована, а была бы результатом постороннего вмешательства. Такие пред-

ставления лежали в основе альтерационной теории Германа и фазовой теории Д. Н. Насонова.

Если же основой протоплазмы служит комплексный полиэлектролитный гель, то причиной неравномерного распределения подвижных ионов явится неспособность макроиона — трехмерной сетчатой структуры с фиксированными на ней зарядами (избытком концевых диссоциирующих групп одного знака заряда) — к диффузии. В таком геле, в связи с необходимостью поддержания электронейтральности геля, будут аккумулироваться подвижные ионы противоположного знака (так называемые «противоионы»). В последнем случае неравномерное распределение подвижных ионов связано не с наличием полунепроницаемой мембраны, а с наличием фиксированных ионов противоположного им знака. Адекватно измерить эту разность потенциалов можно только в том случае, если между полиэлектролитным гелем и внешним раствором имеется фаза раздела. В данном случае разность потенциалов через фазу раздела преформирована, несмотря на то, что неравномерность распределения ионов определяется не свойствами мембраны, а свойствами клеточного содержимого.

Во всех случаях измерения «постоянных» биопотенциалов должны производиться неполяризующимися электродами.

Возможные причины избирательного накопления клеткой некоторых веществ и ионов способных диффундировать через покровы клетки в обоих направлениях. Как уже говорилось, некоторые вещества и ионы, представленные во внешней среде, могли бы аккумулироваться клеткой в связи с тем, что они, проникнув в нее, вступают в химическую связь с веществами, составляющими основу протоплазмы.

Такова, несомненно, судьба аминокислот и некоторых углеводов. Ряд ионов, войдя в состав макромолекулярных соединений цитоплазмы, также, в основном, уже не встречается там в ионном виде. Сюда, несомненно, относятся фосфат-ионы и ионы кальция. Что же касается других ионов, так называемых потенциалообразующих, то сторонники сорбционной теории клеточной проницаемости (Д. Н. Насонов и сотр., 1940—1959) считают, что калий аккумулируется клетками именно потому, что он образует с белками протоплазмы «недиссоциирующие» комплексы, т. е. комплексы, значительно менее растворимые, чем комплексы этих белков с натрием. Последний вследствие этого слабо проникает в клетку.

Другая точка зрения состоит в том, что в клетке ионы калия, натрия и хлора свободны. При этом избирательное накопление клетками ионов калия по сравнению с натрием принято объяснять только свойствами мембраны клетки и локализованных в ней биохимических процессов (так называемая «мембранная теория»).

Третья точка зрения сводится к тому, что избирательное накопление клетками ионов калия объясняется не столько свой-

ствами мембраны и локализованных в ней механизмов, сколько свойствами полиэлектролитных структур, составляющих основу цитоплазмы. Калий избирательно образует с этими структурами ионные комплексы (т. е. противоионами фиксированных на структуре геля отрицательных зарядов являются преимущественно ионы калия), в связи с чем калий не теряет свой индивидуальный заряд в клетке и продолжает существовать там в ионном виде.

Типы теории происхождения биоэлектрических потенциалов. Все вышеупомянутые возможные причины возникновения разности потенциалов между содержимым живых покоящихся клеток и окружающей их средой — потенциала покоя — были в разное время привлечены различными авторами для объяснения причин возникновения биоэлектрических явлений (см. гл. 7). Одни считают, что биопотенциалы возникают из-за наличия полупроницаемой мембраны и существующей благодаря этому несимметричности в распределении ионов, другие — что обмен веществ играет ведущую роль в возникновении разности потенциалов через мембрану (или же путем обеспечения активного переноса ионов, или же путем активного переноса электронов через мембрану); неравномерное распределение ионов в последнем случае надо было бы считать уже следствием наличия разности потенциалов. Некоторые считают, что потенциал покоя возникает только в результате разрушения фазы протоплазмы, другие же — что потенциал покоя предсуществует и обязан своим происхождением не свойствам клеточной мембраны, а свойствам цитоплазмы, являющейся сложной полиэлектролитной системой, избирательно накапливающей калий в ионном виде.

Наибольшее число исследований проведено на нервных и мышечных волокнах, так как основные функции этих объектов теснейшим образом связаны с биоэлектрическими явлениями. Нервные и мышечные волокна возбуждаются под влиянием электрического раздражения; они способны проводить это возбуждение, сопровождающееся местными быстротечными изменениями исходной разности потенциалов (потенциала покоя) по длине своего простирания. Эти изменения, однажды достигнув своего полного развития, не уменьшаются по амплитуде по мере своего распространения вдоль по данной клетке (распространяются без декремента).

Методы измерения потенциала покоя. *До создания внутриклеточных микроэлектродов потенциал покоя измерялся как «демаркационный потенциал», или «потенциал повреждения».* Иными словами, измерялось напряжение между поврежденной и неповрежденной частями ткани. По этим демаркационным потенциалам нельзя было судить об абсолютной величине потенциала покоя, так как в этих условиях практически невозможно избежать шунтирования электродов. Тем не менее этим методом

было получено много интересных данных, касающихся зависимости демаркационного потенциала от состава внешней среды.

Впервые полный потенциал покоя был измерен с помощью внутриклеточных электродов Ходжкиным и Хакслей в 1939 г. и Кэртисом и Колом в 1940 г. на гигантских нервных аксонах кальмара. Они использовали хлорированные тонкие серебряные проволочки или тонкие микропипетки, наполненные раствором KCl, которые вводились в аксон вдоль по его оси. Лишь разработка Грэхем, Лингом и Джерардом (J. Graham, G. Ling, R. Gerard 1946—1949) так называемых «микроэлектродов» (вернее, солевых мостиков), изготовленных из тонких стеклянных капилляров с кончиком, оттянутым до диаметра, не превышающего долей микрона, и наполненных концентрированными растворами электролитов, позволила приступить к адекватным исследованиям биопотенциалов на клетках нормальных размеров.

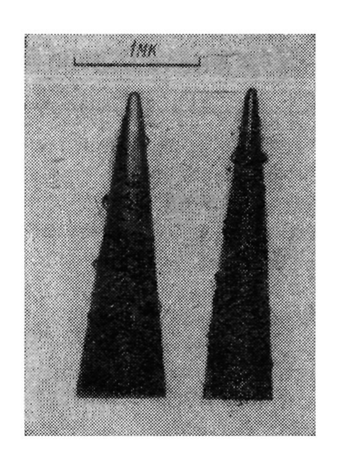


Рис. 72. Электронно-микроскопические снимки кончиков капиллярных микроэлектродов

Кончики таких микрокапилляров из тугоплавкого стекла, диаметром 0,5—0,1 *мк*, оттягиваются из стандартных толстостенных капилляров, внешним диаметром около 1 *мм* на специальных установках, позволяющих изготавливать их в большом количестве. На рис. 72 приводятся фотографии кончиков микроэлектродов, сделанные под электронным микроскопом. Такие микроэлектроды имеют сопротивление порядка 10^6 — 10^8 *ом*, если они заполняются 2,5-молярным раствором KCl или NH_4Cl. Они могут иметь собственный потенциал, достигающий иногда нескольких десятков милливольт. Годны для работы лишь микроэлектроды, имеющие минимальный собственный потенциал при контакте с раствором Рингера. В связи с высоким сопротивлением микроэлектродов их можно применять для введения в клетку и измерения биопотенциалов только в том случае, если они сочетаются с усилителем, снабженным, соответственно, катодным повторителем на входе, или с электрометром (если исследуются только медленно изменяющиеся потенциалы). Сопротивление входа усилительной аппаратуры должно по крайней мере быть в 100 раз выше сопротивления используемых микроэлектродов.

Контрольные эксперименты показали, что введение второго микроэлектрода в волокно в непосредственной близости от ранее введенного не вызывает сколько-нибудь заметного уменьшения потенциала покоя, измеряемого с помощью первого. Введение

микроэлектрода в клетку, по-видимому, не наносит клетке существенного повреждения. Предполагается, что фаза раздела (клеточная мембрана) плотно охватывает шейку микроэлектрода, предупреждая шунтирование вдоль по наружной поверхности капилляра. Этот и ряд других фактов свидетельствуют о том, что разность потенциалов через мембрану преформирована и не является лишь результатом повреждения микроэлектродом протоплазмы. Преимущества этого метода состоят в том, что клеткам наносится минимальное повреждение, что могут исследоваться очень мелкие клетки и даже крупные ядра некоторых клеток и исследования можно вести на отдельных клетках in situ, т. е. в целом живом организме, без предварительной изоляции клетки.

В табл. 11 приводятся значения потенциалов покоя ряда объектов, полученные с помощью внутриклеточных микроэлектродов; внешней средой в каждом случае служил стандартный физиологический раствор, обычно используемый в работе с данным объектом.

Природа потенциала покоя. В настоящее время, как видно из вышеизложенного, не существует еще единого мнения относительно природы потенциала покоя. Все существующие теории наталкиваются на те или иные препятствия — факты, не объяснимые с позиций данной теории — и между сторонниками различных теорий ведутся ожесточенные дискуссии. Ниже вкратце приводятся основные из рассматриваемых в настоящее время теорий.

Одна из первых теорий — мембранная — была сформулирована Бернштейном, который утверждал, что потенциал покоя предсуществует на протоплазматической мембране клетки и обусловлен полупроницаемыми свойствами этой мембраны. По его мнению, мембрана покоящейся клетки проницаема только для ионов калия, но не для ионов натрия и хлора. Именно эти ионы наиболее существенны, так как их концентрация в среде и в клетке достигает наивысших значений. В табл. 12 приводятся данные для внутриклеточных и внеклеточных концентраций этих ионов в наиболее распространенных объектах исследования.

Таблица 12

Внутри- и внеклеточные концентрации основных ионов для классических объектов

Объект	Среда (*мг·ион/л*)			Клетка (*мг·ион/кг выпариваемой воды*)		
	Na^+	K^+	Cl^-	Na^+	K^+	Cl^-
Поперечнополосатые мышечные волокна лягушки	120	2,5	121	0—38	125—140	0,8—2,0
Гигантский аксон кальмара	440	22	560	49	410	40

Бойль и Конвей (P. Boyle a. E. Conway) высказывали предположение, что через мембрану клетки устанавливается специфическое распределение ионов, характерное для равновесия Доннана.

Мембранный потенциал ($E_м$) в клетке тогда должен быть связан с отношением концентраций ионов калия и хлора согласно формуле

$$E_м = -58 \lg \frac{[K^+]_в}{[K^+]_н} = -58 \lg \frac{[Cl^-]_н}{[Cl^-]_в} \text{ милливольт.} \qquad (8.21)$$

Экспериментальные данные этих авторов относительно распределения ионов подтвердили, что в пределах $[K^+]_н$ от 12 до 300 *мг*×*ион/л* условия доннановского равновесия, т. е. $[K^+]_в \times [Cl^-]_в = [K^+]_н \times [Cl^-]_н$, в первом приближении соблюдаются.

Одной из важнейших предпосылок теории Бойля и Конвея была непроницаемость мембраны мышечного волокна для ионов натрия. Однако опыты с меченым натрием, выполненные, примерно, в то же время другими авторами, ясно показали, что ионы натрия способны проникать через мембраны нервов и мышц, причем с тем же успехом, что ионы калия. Это потребовало модификации данной теории. Дин (Dean) высказал предположение: «Проницаемость мембраны для ионов натрия не помешает приложимости закономерностей доннановского равновесия к ионному распределению и к потенциалу покоя, если предположить, что имеется механизм, «выкачивающий» ионы натрия из клетки с той же скоростью, как они туда поступают по электрохимическому градиенту». Чтобы процесс этот не повлиял на электрические явления, нужно предположить, что натрий из клетки выводится в сочетании с каким-то анионом или же в обмен на другой катион, например ион калия. С тех пор эта теория интенсивно разрабатывалась многими авторами, но идентифицировать «мембранный насос» с какими-либо биохимическими или физико-химическими процессами до сих пор не удалось.

Кейнсом (R. Keynes) было показано, что калий концентрируется в аксоплазме гигантского нервного аксона в ионном виде (в отличие от фосфата и кальция); Харрис (E. Harris) получил аналогичные данные на мышце. Было установлено, что меченый калий, предварительно введенный в участок волокна, способен перемещаться вдоль по волокну под действием сил наложенного извне электрического поля и под влиянием обменной диффузии. Это относится по крайней мере к 90% общего количества внутриклеточного калия.

При изменении ионного состава внешней среды происходит перераспределение ионов между клетками и средой. В результате устанавливается новое распределение ионов, соответствующее измененным внеклеточным концентрациям и новому осмотическому давлению среды.

Если при изменении наружных концентраций ионов калия и хлора соблюдается условие доннановского распределения, т. е. произведение $[K^+]_н \cdot [Cl^-]_н$ является постоянной величиной, то изменение потенциала покоя волокна скелетной мышцы лягушки может довольно строго соответствовать уравнению Нернста, т. е. величина потенциала покоя оказывается пропорциональной отношениям $[K^+_в]$ / $[K^+]_н$ и $[Cl^-]_н/[Cl^-]_в$. Это наблюдается при изменении $[K^+]_н$ от 10 до 75 *мг·ион/л*, а $[Cl^+]_н$, соответственно, от 30 до 4 *мг·ион/л*. Однако, при $[K^+]_н$ ниже 10 *мг*×*ион/л* и соответствующих $[Cl^-]_н$, вплоть до нормальных для раствора Рингера концентраций (2,5 *мг·ион/л* K^+ и 121 *мг·ион/л* Cl^-), наблюдаются существенные отклонения от этих закономерностей: экспериментально получаемые величины существенно ниже, чем рассчитанные по уравнению Нернста. Если бы избирательность клетки определялась только свойствами мембраны (а содержимое при этом рассматривается как гомогенный раствор), то следовало бы ожидать, что любые произвольные изменения $[K^+]_в$ должны были бы приводить к адекватным изменениям потенциала покоя. Однако микроинъекции ионов калия в сочетании с неорганическими или органическими анионами в гигантский аксон кальмара или каракатицы и в поперечнополосатое мышечное волокно не приводит к заметным изменениям величины потенциала покоя. Этого изменения можно добиться только повышая $[K^+]_в$ перенесением объекта в гипертонический раствор, т. е. путем обезвоживания клетки. Но и в этом случае изменения величины потенциала покоя не адекватны изменениям $[K^+]_в$, определяемой, обычно, как количество калия, относимого к объему выпариваемой из объекта воды.

Уравнение Нернста строго приложимо только к условиям равновесия. Изолированное же нервное или мышечное волокно не находится в равновесии с искусственной средой. Саймон и сотр., например, нашли, что изолированная мышца жабы в растворе Рингера за два часа приобретает значительное количество натрия и одновременно с этим теряет некоторое количество калия. Этими процессами часто объясняют отклонения экспериментальных величин от расчетных при излучении потенциала покоя на изолированных объектах, исследуемых в растворе Рингера или иных адекватных физиологических средах. Величины потенциалов покоя гигантских аксонов головоногих молюсков или мышечных волокон in situ (или в гемолимфе и, соответственно, в лимфе), значительно ближе к расчетным. Однако одним этим объяснением ограничиваться нельзя.

Отклонения эти, несомненно, связаны с тем, что протоплазма не является гомогенным раствором электролитов. Она состоит из структурированной и из свободнорастворяющей части. При уменьшении доли последней в общем объеме протоплазмы путем обезвоживания клетки вышеупомянутые отклонения исчезают

(Г. А. Курелла и Лян Зы-Тюнь, 1964). Дело, таким образом, не в ионах натрия, которые, по мнению этих авторов, распределяются пассивно между клеткой и средой, а в степени оводненности клетки. В лимфе клетки слабее набухают, поэтому в них мало́ свободнорастворяющее пространство.

Влияние температуры на потенциал покоя. Одним из факторов пропорциональности в уравнении Нернста служит абсолютная температура. Поэтому изменение температуры должно приводить к совершенно определенным изменениям потенциала покоя.

По теории температурный коэффициент для потенциала покоя должен быть равен ~1,035, если это чисто физическое явление, описываемое уравнением Нернста. Зависимость потенциала покоя, определенная экспериментально, оказалась 1,033—1,100 (G. Ling a. L. Woodbury). Это свидетельствует о том, что уравнение Нернста справедливо для потенциала покоя. Однако если ионная мембранная теория справедлива, длительное выдерживание объекта при низкой температуре должно было бы приводить к относительно быстрому падению величины потенциала покоя, так как согласно этой теории, предполагается, что натрий из клетки удаляется мембранными «насосами», причем последние могут быть только метаболическими, а биохимические процессы имеют значительно более высокий температурный коэффициент. Поступление же натрия в клетку этой теорией рассматривается как диффузия, т. е. как физический процесс, для которого характерны температурные коэффициенты вышеуказанного порядка. Поэтому при низкой температуре скорость поступления натрия в клетку должна была бы значительно превосходить скорость удаления натрия из клетки «насосами». Соответственно быстрее должна падать и величина потенциала покоя.

Обмен веществ и потенциал покоя. Для поддержания потенциала покоя, несомненно, необходимо нормальное протекание клеточного метаболизма. Выше уже упоминалось, что связь обмена веществ с потенциалом покоя может быть различной. Обмен веществ может обеспечивать работу каких-либо мембранных насосов, при которых перенос (поток) ионов равносилен установлению электрического тока через мембрану. Согласно другим представлениям, обмен веществ может обеспечивать поддержание потенциала покоя через окислительно-восстановительную систему, осуществляющую перенос электронов или протонов через мембрану. В обоих случаях обмен веществ непосредственно обеспечивал бы избирательное накопление катионов в клетке и поддержание потенциала покоя. Чтобы этими катионами были именно ионы калия, эти процессы должны были бы обладать ионной специфичностью. Обмен веществ мог бы осуществлять перенос из клетки анионно-натриевого незаряженного комплекса через мембрану или обеспечивать калиево-натриевый

обмен через мембрану. Это — процессы сами по себе электрически нейтральные, но приводящие к пассивному установлению ионной асимметрии, точнее аккумуляции калия в клетке и возникновению потенциала покоя, описываемого уравнением Нернста для калия и хлора. Согласно третьей точке зрения, предполагается, что обмен веществ обеспечивает только поддержание какой-то специфической упорядоченной структуры клеточного содержимого, а эта структура, в свою очередь, обеспечивает избирательное накопление одних ионов (калия) и не допускает в структурированный объем клетки другие ионы того же знака заряда (натрий). В двух первых случаях действие ингибитора обмена должно приводить к быстрому падению потенциала покоя. В третьем случае уменьшение потенциала покоя в результате действия ингибиторов может происходить очень медленно. Опыты показали, что действие ингибиторов приводит лишь к незначительному ускорению падения величины потенциала покоя и соответствующему перераспределению ионов натрия и калия между клеткой и средой по сравнению с таковым в переживающих органах, не подвергшихся действию ингибиторов. При этом совместное действие ингибиторов и низкой температуры приводит не к ускоренному падению величины потенциала покоя, по сравнению со скоростью его падения при действии одного из этих факторов, а наоборот, к замедлению этого падения.

Важнейшими источниками энергии считаются макроэргические фосфорные соединения: аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), аденозиндифосфорная кислота (АДФ), а также креатинофосфат (КрФ) или аргининфосфат (АрФ), при этом последние два — стабильные, депонирующие энергию соединения. Доступная для использования в рассматриваемых процессах энергия, по-видимому, может поставляться только этими соединениями. Различные ингибиторы обмена действуют на различные звенья цепей и циклов синтеза макроэргических соединений. Упрощенная схема приведена на рис. 73, где показано, в какой степени различные ингибиторы действуют на синтез макроэргических соединений из углеводов.

Данные, полученные при экспериментальном исследовании действия ингибиторов обмена на потенциал покоя и распределение ионов, очень разноречивы. Наиболее широкую известность получили данные Шейнса (A. Shanes), показавшего, что удаление натрия из нерва жабы не зависит непосредственно от обмена веществ.

Очень убедительны также данные Линга, который показал, что содержание натрия в мышце не увеличивается заметным образом на протяжении 5 *ч* в условиях абсолютной аноксии в присутствии заведомо прекращающего синтез АТФ в ходе гликолиза количества моноиодацетата при температуре около 0° С. Таким образом, совместное действие двух факторов, по отдельности

несколько ускоряющих процессы, приводящие к падению потенциала покоя, ведет к замедлению накопления ионов натрия и падению потенциала покоя в волокнах поперечнополосатых мышц. При этом прямое определение АТФ, КрФ и внутриклеточных концентраций ионов показало, что в пределах точности методов, содержание этих веществ в подопытных мышцах не отличалось от количества этих веществ в контрольных парных мышцах. Это значит, что если бы существовали мембранные ионные насосы,

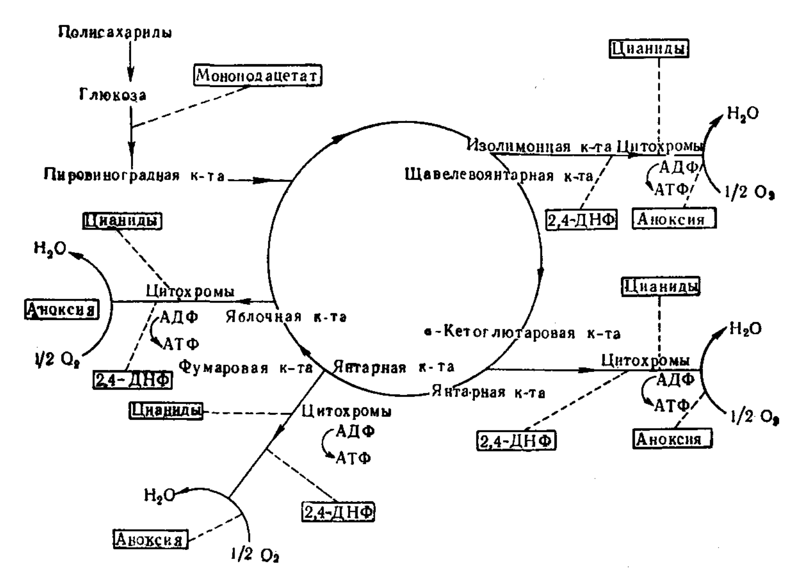


Рис. 73. Действие ингибиторов на синтез макроэргических фосфорных соединений из углеводов. Макроэргические фосфорные соединения образуются в точках, помеченных «АДФ → АТФ»; специфические ингибиторы помещены в рамки; пунктир указывает на участки цикла, в которых действуют ингибиторы

даже такие, которые удаляют натрий из клетки в виде незаряженного натриевого комплекса, коэффициент полезного действия этих насосов был бы порядка 400%, что, естественно, невозможно. Все это свидетельствует о том, что наиболее вероятный из перечисленных вариантов — третий, при котором обмен веществ влияет на распределение ионов и на потенциал покоя косвенно — через поддержание стационарного состояния специфических, избирательных по отношению к ионам калия, полиэлектролитных структур протоплазмы. Необходимость постулата о существовании мембранных насосов, работа которых непосредственно обеспечивается обменом веществ,— отпадает.

Скачок потенциала на мембране клеточного ядра. Относительно недавно было обнаружено, что на границе цитоплазмы с ядром

в некоторых клетках (за исключением ооцитов) удается обнаружить дополнительный скачок потенциала того же направления, что и на мембране клетки. Причем на ядрах нейронов некоторых моллюсков и на ядрах клеток слюнной железы личинок дрозофилы этот скачок по величине почти равен величине скачка потенциала на клеточной мембране. Первые опыты на клетках слюнных желез личинки дрозофилы (В. Ф. Антонов, Г. А. Курелла, И. Ф. Мещишен, У Бень-дзе, 1965) показали, что этот скачок потенциала на ядерной мембране реагирует на изменения концентрации Na^+ в среде и не реагирует на соответствующие изменения концентрации K^+ (в отличие от скачка потенциала на наружной клеточной мембране, который практически не реагирует на изменения концентрации ионов натрия в среде, а только на изменения концентрации K). Вопросы эти требуют еще дальнейшего экспериментального исследования, однако эти данные соответствуют данным некоторых авторов об аккумуляции ядрами клеток ионов натрия.

Все это может служить дополнительным доводом в пользу того, что избирательное накопление тех или иных ионов в клетках в целом и в отдельных органоидах есть функция структурных элементов соответствующей плазмы (цитоплазмы, кариоплазмы и т. д.), а не только поверхностных структур — фаз раздела (мембран).

Разность потенциалов через кожу лягушки. Из многочисленных случаев возникновения разностей потенциалов через границы раздела отдельных органов мы рассмотрим явления, возникающие на коже лягушки. На этом примере можно убедиться в том, что в организме совершается ряд процессов, связанных с активным переносом веществ против концентрационных и электрохимических градиентов. В данном случае имеет место активный перенос ионов натрия. Работами Крога (A. Krogh) было показано, что кожа лягушки способна поглощать ионы натрия из среды, содержащей хлористый натрий в концентрации 10^{-5} М, переносить их в лимфу, где концентрация в 10 000 раз выше, т. е. порядка 10^{-1} М. Ионы калия и кальция через кожу лягушки не концентрируются в организме.

Уссинг и сотрудники (H. Ussing) разработали метод изучения активного транспорта натрия через кожу лягушки. Схема их установки приведена на рис. 74.

Если разделить две камеры, содержащие нормальный раствор Рингера, свежеизолированной кожей лягушки, то между наружной и внутренней поверхностями кожи возникает разность потенциалов, величина которой может достигать 100 *мв* (внутренняя поверхность кожи положительна по сравнению с наружной). Подавая от внешнего источника э. д. с. напряжение противоположного направления, можно скомпенсировать разность потенциалов через кожу. В этих условиях перенос ионов через кожу

под влиянием электрических полей невозможен так же, как и путем диффузии, так как растворы по обе стороны кожи идентичны. Тем не менее продолжает иметь место перенос ионов натрия (и только этих ионов) в направлении от наружной поверхности к внутренней, что легко доказать, используя меченый натрий. Это не значит, что через кожу не идет обменная диффузия всех ионов, однако потоки ионов хлора в этих условиях равны в обоих направлениях, а потоки ионов натрия неодинаковы.

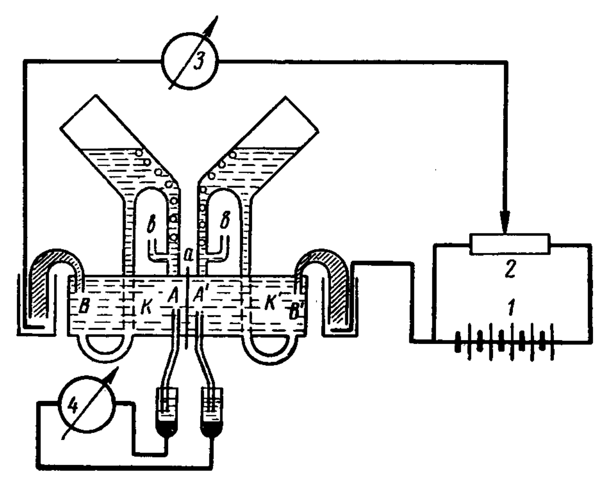


Рис. 74. Схема установки для исследования переноса ионов Na^+ и тока короткого замыкания через изолированную кожу лягушки (по Зерану и Усингу):

К — камера; *a* — кожа лягушки; *b* — ввод воздуха; *А* и A_1— агарово-рингеровские мостики; *В* и B_1— мостики для наложения внешней э.д.с.; *1* — батарея; *2* — делитель напряжения; *3* — микроамперметр; *4* — ламповый вольтметр

О том, что имеет место однонаправленный перенос ионов натрия, можно судить и по величине электрического тока, протекающего по компенсационной цепи. Так как разность потенциалов скомпенсирована, то ток в компенсационной цепи численно равен по величине току, возникающему благодаря одностороннему переносу через кожу положительных зарядов, т. е. ионов натрия.

Активный перенос натрия через кожу лягушки непосредственно связан с обменом веществ, в первую очередь с окислительным фосфорилированием и дыханием. Многочисленные ингибиторы отдельных фаз гликолитического обмена и окислительного фосфорилирования приводят немедленно к существенному снижению или прекращению переноса ионов натрия и к исчезновению разности потенциалов через кожу. Такой же эффект вызывает строфантин. Было также показано, что при идентичных средах

по обе стороны препарата на перенос 18 эквивалентов натрия кожа потребляет один моль O_2. Есть вещества, интенсифицирующие активный перенос ионов натрия через кожу. К ним относятся, например, гипофизарные гормоны. Соответственно увеличивается и разность потенциалов через объект.

БЫСТРЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗНОСТИ ПОТЕНЦИАЛОВ

Потенциал действия. *Быстрые изменения разности потенциалов через мембрану клетки обычно связаны со структурными изменениями в самой клетке, или в примыкающей к ней клетке, или в составе внеклеточной среды.* Такого рода электрические

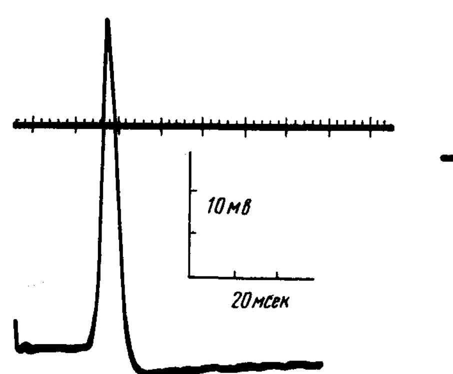


Рис. 75. Потенциал действия, измеренный с помощью капиллярного микроэлектрода, введенного в большой нейрон правого париентального ганглия улитки *Helix aspersa* (по Риджу и Уолкеру)

Рис. 76. Потенциал действия гигантского аксона кальмара, измеренный с помощью металлического микроэлектрода, введенного вдоль по оси аксона (по Ходжкину и Хакслей). Отметка времени — 500 *гц*; напряжение в милливольтах

изменения — импульсы — в большинстве случаев принято связывать с передачей информации от рецептора к эффектору непосредственно, или через координирующие центры. *Наиболее распространенная форма проводимого импульса — так называемый потенциал действия.* Такой потенциал действия, при регистрации его с помощью внутриклеточных солевых мостиков (микроэлектродов), введенных в нейрон, изображен на рис. 75.

Потенциал действия состоит из восходящей фазы — деполяризации, т. е. уменьшения величин потенциала покоя, и, чаще всего, противоположной по знаку реполяризации клеточной поверхности,— и из нисходящей фазы — фазы спада потенциала действия, т. е. возврата разности потенциалов через мембрану

до значения исходного потенциала покоя. При этом разность потенциалов через фазу раздела протоплазмы и среды — мембрану — перед достижением исходного значения потенциала покоя обычно проходит еще через фазу гиперполяризации.

Существуют и другие типы быстрых изменений биоэлектрических потенциалов — генераторные потенциалы клеток рецепторов, секреторные потенциалы железистых клеток. Часто изучаются также и сложные, составные, быстро изменяющиеся разности потенциалов между различными участками целого организма типа электрокардиограмм, электроэнцефалограмм, электроретинограмм, электромиограмм и т. п., отражающие суммарную активность множества клеток одного и того же органа. Кроме того, существуют многочисленные модификации основной формы потенциала действия, характерные для клеток специфических тканей.

Формирование потенциала действия. Выше уже упоминалось, что потенциал действия — проводимая вдоль по нервному аксону или мышечному волокну волна электрической активности, играющая роль импульса или сигнала.

Каков механизм генезиса потенциала действия и каковы источники энергии, обеспечивающие бесдекрементное распространение импульса по всей длине нервного аксона, достигающей иногда размера более метра (например, нервы инервирующие стопу крупных млекопитающих)?

Первая теория, относительно удовлетворительно объясняющая явления, связанные с возникновением потенциала действия, была выдвинута Бернштейном. Он считал, что во время возбуждения, составным элементом которого является потенциал действия, клеточная мембрана становится проницаемой для всех видов ионов, и потенциал покоя, обусловленный несимметричным распределением ионов, в связи с выравниванием концентраций по обе стороны мембраны, падает до нуля. Таким образом, потенциал действия считался волной деполяризации мембраны и его амплитуда не должна была превышать величину потенциала покоя. Эта точка зрения оставалась общепринятой до тех пор, пока исследования Ходжкина и Хакслей, а также Кэртиса и Кола, проведенные на гигантских амиелиновых волокнах кальмаров, а затем и на других, более мелких объектах, с помощью разработанных Грэхем, Линг и Джерардом микроэлектродов, не сделали возможным достоверно измерять абсолютную величину потенциала покоя и действия. Оказалось, что амплитуда потенциала действия, как правило, значительно превышает величину потенциала покоя. На рис. 76 приводится типичный потенциал действия, зарегистрированный от аксона кальмара с помощью металлического коаксиального внутриклеточного электрода.

Трактовка этого явления (получившего название «овершут», т. е. «перелет») различными авторами в первую очередь зависит от их точки зрения на природу потенциала покоя. Все гипотезы

исходят или же из представлений о ведущей роли активных метаболических процессов, или же из выявленных экспериментально электрических свойств клеточной мембраны. Поскольку со временем такие электрические параметры как сопротивление, емкость и индуктивность для различных клеток были определены при трактовке явления перезарядки мембраны к моменту максимума потенциала действия, стали оперировать этими величинами и строить эквивалентные цепи. Пример такой эквивалентной цепи приводится на рис. 77. В эту схему входят параллельно включенные источники постоянных э.д.с. с переменными внутренними сопротивлениями «калиевая батарейка» V_K и сопротивление R_K, «натриевая батарейка» V_{Na} и сопротивление R_{Na} (а также сопротивление утечки R_y и батарейка V_y, введенные для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не изменяются во время активности, в частности ионов хлора); r — сопротивление осевого цилиндра аксона, который связывает разные участки мембраны. Наружный раствор из-за большого объема может считаться эквипотенциальной жидкостью и на схеме его можно представить проводником без сопротивления. Наличие в такой цепи соединенных в параллель емкости и переменных сопротивлений могло бы приводить к появлению овершута при «коротком замыкании» источника э. д. с., например, когда исходно очень высокое внутреннее сопротивление натриевой батарейки, включенной навстречу калиевой и хлорной, внезапно падает до значений, значительно меньших внутреннего сопротивления калиевой батарейки.

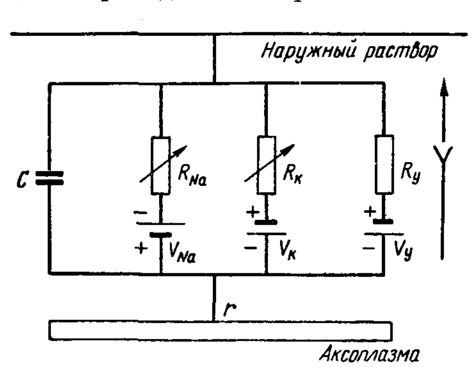


Рис. 77. Электрическая аналоговая схема нервного волокна.
Объяснение см. в тексте

Другие гипотезы делали упор на химическую сторону дела. Предполагалось, например, что мембрана состоит из полярных молекул, которые могут переориентироваться в момент потенциала действия. Выдвигалось даже предположение, что мембрана при возбуждении становится проницаемой для ранее неспособных к диффузии через нее органических анионов, обусловливающих несимметричное распределение остальных ионов между покоящейся клеткой и средой.

Наиболее обоснованной оказалась теория, разработанная Ходжкиным и Катцем, которые предположили, что потенциал действия связан с внезапным значительным увеличением потока ионов натрия через мембрану в клетку на переднем фронте рас-

пространяющейся волны возбуждения, т. е. у переднего фронта потенциала действия. Предполагалось, что возрастание потока ионов натрия через мембрану аксона обусловлено внезапным падением сопротивления мембраны для этих ионов. Экспериментально проверить это предположение можно, варьируя концентрацию ионов натрия во внешней среде. Оказалось, что величина потенциала действия действительно зависит от концентрации ионов натрия в среде. На рис. 78 видно, что при малых концентрациях натрия в среде амплитуда потенциала действия уменьшается, последняя уменьшается также, если ионы натрия накапливаются в аксоне (в результате длительного выдерживания аксона в среде с повышенным содержанием натрия). Резкое возрастание потока ионов натрия в клетку приводит к тому, что господствующей оказывается э. д. с., образующаяся в результате диффузии ионов натрия в клетку, т. е. разность потенциалов на вершине потенциала действия должна численно равняться величине, рассчитываемой по уравнению Нернста на основе отношения концентрации ионов натрия в среде и в аксоне.

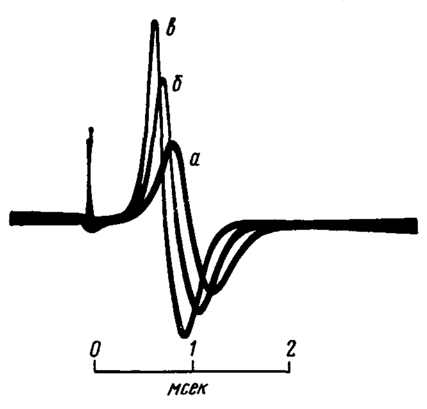


Рис. 78. Роль ионов натрия в развитии потенциала действия (по Ходжкину и Катцу):

а — нерв на 12 *мин* помещен в раствор, состоящий на 50% из морской воды и на 50% из изотонического раствора декстрозы; *б* — нерв затем помещен на 16 *мин* в морскую воду, *в* — нерв на 2 *мин* помещен в морскую воду содержащую в 1,56 раз больше ионов натрия, чем в норме. Амплитуда и крутизна восходящей фазы потенциала действия тем больше, чем выше концентрация ионов натрия в среде

Во время каждого потенциала действия имеет место накопление ионов натрия в аксоне или мышечном волокне и потеря клеткой ионов калия. Если потенциалы действия не часто следуют друг за другом, механизмы, обеспечивающие избирательное распределение ионов, успевают удалить поступивший в начальную фазу потенциала действия в клетку излишек ионов натрия и вновь аккумулировать покинувший клетку калий, т. е. восстановить условия покоя. При длительном же раздражении аксона с максимально допустимой частотой скорость накопления ионов натрия в изолированном аксоне возрастает в 20 раз, по сравнению с покоящимся изолированным аксоном, а скорость выхода калия из аксона возрастает в 10 раз (Ходжкин и Кейнс, 1955).

Общая длительность одиночного потенциала действия на аксоне кальмара составляет 2—3 миллисекунды, после чего вновь устанавливается уровень потенциала покоя. Крутизна нарастания потенциала действия достигает 450 *в/сек*.

В связи с тем, что обычные методы изучения биопотенциалов не позволяют идентифицировать ионы, принимающие участие в процессе, приходится прибегать к различным методическим ухищрениям, чтобы получить представление о динамике потоков отдельных видов ионов. Наибольший успех при исследовании индивидуальных потоков ионов во время потенциала действия

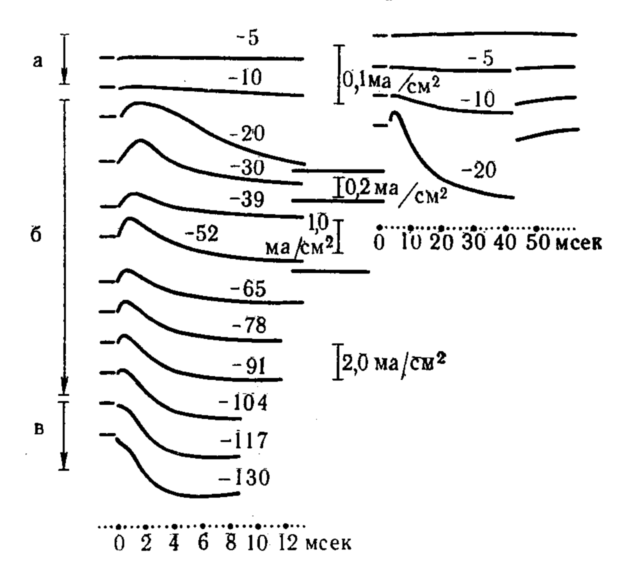


Рис. 79. Метод «гальванического зажима» (по Ходжкину, Хакслей и Катцу). Приводятся записи изменений тока через мембрану во времени при различных значениях навязанной аксону разности потенциалов через мембрану. Цифры, помещенные над кривыми — значение степени смещения разности потенциалов через мембрану по отношению к потенциалу покоя. Ток, направленный в клетку, соответствует смещению кривой вверх

был достигнут при использовании метода «гальванического зажима», т. е. метода фиксации разности потенциалов между содержимым клетки и средой на каком-то заранее заданном уровне. Метод этот был разработан Мармонтом (Marmont, 1949) и применен Ходжкиным, Хакслей и Катцем (1952).

Во время потенциала действия разность потенциалов через определенный участок мембраны постоянно меняется. Существует очень тесное сопряжение между величиной разности потенциалов через мембрану и потоками ионов через нее. Изменение напряжения через мембрану влияет на величину потоков ионов, а изменение потоков ионов находит свое отражение в величине разности потенциалов через мембрану. Поэтому было принято, что если

искусственно поддерживать напряжение, характерное для того или иного момента развивающегося потенциала действия, то окажутся зафиксированными на некоторое время также и величины потоков различных ионов через мембрану, характерные для данной фазы потенциала действия. При внезапной искусственной фиксации разности потенциалов через мембрану во время развития потенциала действия на каком-то заранее определенном уровне на срок в 10—15 *мсек*, график, отображающий электрический ток через мембрану (при данном значении навязанного потенциала), состоит из двух фаз. Ионный ток, который идет на протяжении всего периода активности, может быть измерен. Направление тока зависит от степени смещения мембранного потенциала (рис. 79). Когда в результате деполяризации мембранный потенциал смещается на 1—15 *мв* (*а*), замечается незначительный ток, направленный из клетки, несколько возрастающий во времени. Деполяризация в пределах 15—110 *мв* (*б*) первоначально вызывает ток, направленный в клетку (изображается как смещение кривой вверх) — 1-я фаза, за которым следует ток, направленный из клетки — 2-я фаза. Начиная со смещения потенциала примерно на 110 *мв* (*в*), направленный в клетку ток исчезает; вместо него сразу наступает вторая фаза — фаза выхода ионов из клетки. Проблема состояла в том, чтобы идентифицировать ионы — носители этих токов.

Выше говорилось о том, что начальная фаза потенциала действия, по-видимому, связана с поступлением ионов натрия в клетку. При замене хлористого натрия во внешней среде, омывающей аксон, на холинхлорид, который, как считается, не влияет на величину потенциала покоя, первоначальный ток, направленный в клетку, в пределах деполяризации на 15—110 *мв* полностью исчезал. Ток, направленный из клетки, изменялся при этом незначительно (рис. 80). При восстановлении исходного состава среды вновь наблюдались первоначальные эффекты. Ток, направленный в аксон, не наблюдался и в нормальной среде (искусственной морской воды), если степень принудительной деполяризации превышала 90—117 *мв*; картина была сходной с наблюдаемой при отсутствии натрия в среде. Отсутствие первой фазы в случае деполяризации мембраны до ~117 *мв* объясняется тем, что при таких значениях налагаемого извне напряжения достигается и превышается равновесный потенциал по натрию, и ионы натрия не могут устремляться в аксон.

Таким образом, все результаты, полученные в описываемых опытах, находятся в качественном согласии с теорией, гласящей, что ионы натрия, по крайней мере для гигантского аксона головоногих моллюсков, являются носителями тока, направленного в аксоплазму. Авторам оставалось проверить, действительно ли величина потенциала действия пропорциональна соотношению внутриклеточных и внеклеточных концентраций ионов натрия.

Для этого постепенно изменялась концентрация ионов натрия в среде; экспериментальные результаты показали, что первая фаза изменяется пропорционально концентрации ионов натрия в среде.

Что же касается второй фазы тока — направленного из клетки, то возникает вопрос, связан ли он с фазой падения потенциала действия и какими ионными сдвигами он обусловлен. Дело в том, что ток, направленный из клетки, в опытах с фиксацией напряжения часто превышает таковой при нормальном потенциале

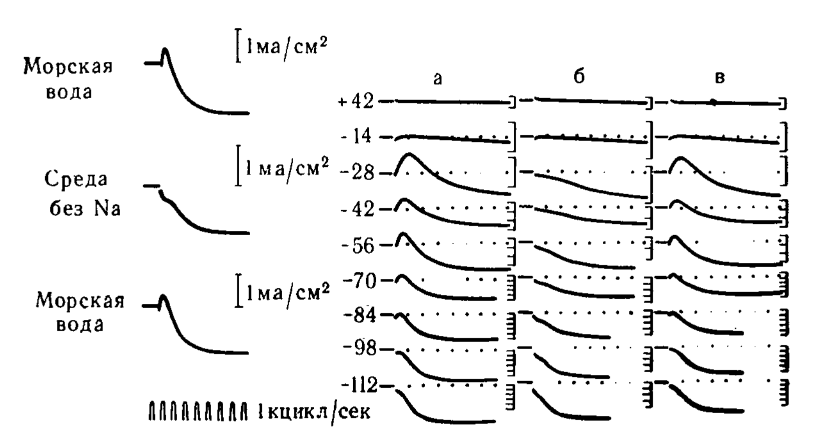


Рис. 80. Кривые регистрации электрического тока через мембрану гигантского аксона кальмара при различных значениях фиксирующего напряжения (по Ходжкину и Хакслей):

а — аксон в морской воде; *б* — аксон в морской воде, где Na^+ был замещен на холин; *в* — аксон возвращен в морскую воду.

Вертикальная шкала — *1* деление — 0,5 *мА/см²*; горизонтальная шкала — расстояние между двумя точками — 1 *мсек*. Ток, направленный в клетку — смещение кривой вверх

действия. Нормальная длительность потенциала действия недостаточна, чтобы дать этому току достичь максимума. Отсюда следует, что продленный ток, направленный из клетки, и есть тот самый ток, который вызывает фазу падения потенциала действия. По всем имеющимся данным носителями этого тока являются ионы калия (по крайней мере, у аксона кальмара). Однако для окончательного доказательства необходимо разработать метод прямого, а не косвенного исследования индивидуальных потоков ионов во время нормального одиночного потенциала действия.

Исходя из вышесказанного, можно сделать заключение о развитии потенциала действия на аксоне кальмара.

Для того чтобы вызвать появление потенциала действия, мембранный потенциал должен быть смещен по крайней мере на 15 *мв*. Если возбудить нерв и вызвать появление потенциала действия, то ток, проходящий в области активного участка

(в направлении образованного участка деполяризации поверхности аксона), деполяризует соседний участок мембраны. Такое снижение потенциала покоя открывает путь усиленному потоку натрия, направленного во внутрь, так как внешняя концентрация ионов натрия в несколько раз превышает его внутреннюю концентрацию. Ток, создаваемый ионами натрия, еще сильнее деполяризует аксон. Это длится до тех пор, пока разность потенциалов через мембрану, пройдя через нуль, не изменит свой знак на обратный и не приблизится к равновесному значению для ионов натрия (рис. 81 и рис. 82).

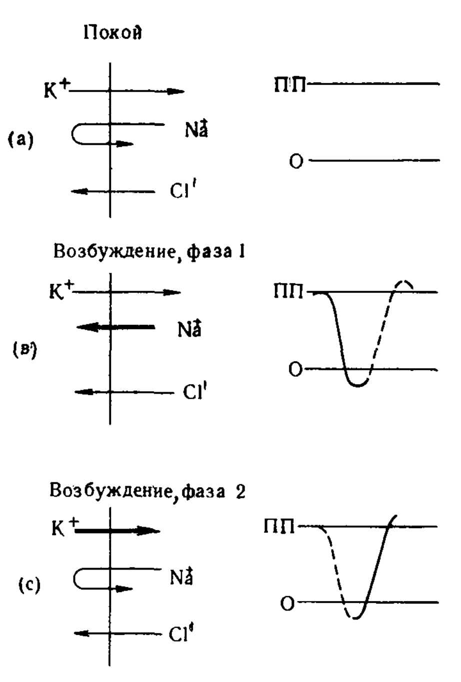


Рис. 81. Изменение индивидуальных потоков натрия и калия во время развития потенциала действия (по Ходжкину)

Более поздним результатом деполяризации мембраны является возникновение тока положительно заряженных ионов, направленного из аксона наружу. Носителями этого тока, по всей вероятности, являются ионы калия, поскольку их концентрация в клетке значительно выше, чем в среде. К этому времени первоначально резко усилившийся поток ионов натрия в клетку, постепенно уменьшается. Когда ток, обусловленный выходом ионов калия из аксона, станет равным или бóльшим тока, направленного в клетку, обусловленного ионами натрия, мембрана снова начинает поляризоваться, и потенциал покоя повысится до уровня, соответствующего состоянию покоя, т. е. равновесного потенциала для ионов калия (и хлора). Причины резкого изменения потоков ионов натрия и калия во время потенциала действия и причины несовпадения максимумов этих потоков во времени в настоящее время еще недостаточно выяснены.

Этот общий принцип формирования потенциала действия с небольшими вариациями подтвержден в ходе исследований различных авторов, изучавших формирование потенциалов действия на других объектах. Примером могут служить работы Хагивара и Сайто (S. Hagiwara a. N. Saito) на нейроне моллюска *Onchidium verriculatum*. Формирование потенциала действия на поперечнополосатых мышечных волокнах происходит подоб-

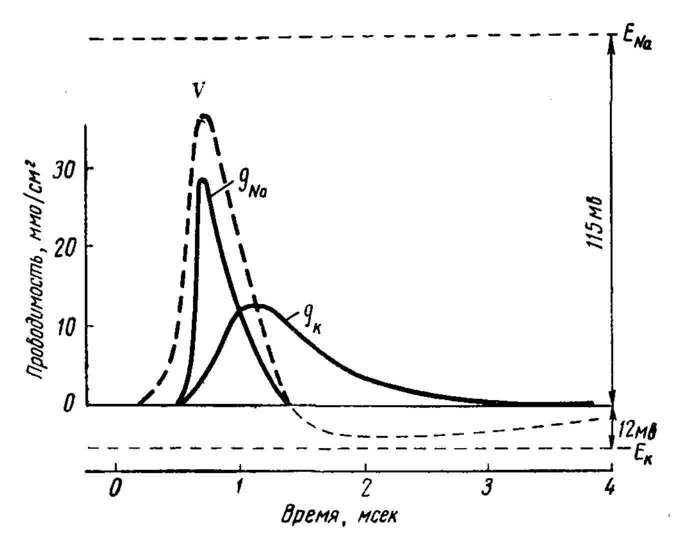


Рис. 82. Сводные кривые изменения индивидуальных потоков натрия и калия во время развития потенциала действия (по Ходжкину и Хакслей): g — поток в *ммо/см²*, V — потенциал действия в *мв*

ным же образом. Здесь первоначально значительно возрастает поток ионов натрия в клетку по сравнению с состоянием покоя, а затем, 200 *мсек* спустя, резко возрастает поток ионов калия из клетки. Общее количество натрия, дополнительно поступающее в мышечное волокно, судя по экспериментам и расчетам различных авторов, составляет $9—15 \times \times 10^{-12}$ *М/см²*, в то время как на гигантском аксоне кальмара оно составляет $3—4 \times 10^{-12}$ *М/см²*. Снижение внеклеточной концентрации ионов натрия приводит к изменению амплитуды потенциала действия в соответствии с этой концентрацией.

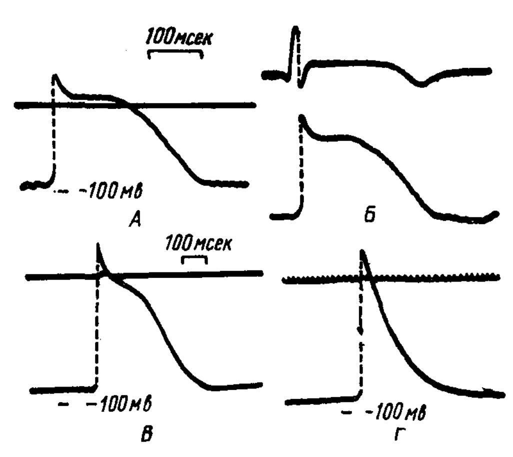


Рис. 83. Потенциал действия мышечных волокон сердца. Капиллярный микроэлектрод вводился в волокна различных участков сердца: *А* — желудочка; *Б* — желудочка (верхняя кривая — электрокардиограмма, приведенная для сравнения); *В* — волокна Пуркинье; *Г* — предсердия

Потенциалы действия синцитиальных волокон миокарда несколько отличаются от потенциалов действия волокон скелет-

ной мускулатуры. Они состоят из крутой восходящей фазы, за которой следует более или менее выраженное плато, и лишь затем — фазы спада до исходного диастолического значения разности потенциалов через мембрану. По-видимому, в данном случае имеет место еще большее разобщение во времени максимума натриевого потока в клетку и калиевого потока из клетки (рис. 83).

Электрические органы. Большинство электрических органов рыб — видоизмененная мышечная ткань. Мышечные волокна приспособлены к быстрой реализации накопленной энергии при сокращении. В данном же случае энергия эта используется для генерации довольно мощного электрического импульса. Модифицированные мышечные волокна или мионевральные пластинки, образующие элементы электрического органа — электрические пластины, — имеют вид плоских ячеек многоядерной протоплазмы, каждая из которых иннервируется с одной стороны нервным волокном. Они расположены таким образом, что напоминают столбики элемента Вольта и образуют как бы органическую батарею. Потенциал покоя пластин электрического органа ската *Raja clavata* составляет примерно 70 *мв*. Потенциал действия не на много превышает величину потенциала покоя, его амплитуда составляет 75—80 *мв*. В состоянии покоя нет разности потенциалов между ростральной и каудальной поверхностями отдельной пластины. Однако при развитии потенциала действия эти поверхности деполяризуются неодинаково. В результате этого на каждой пластине при возбуждении между обоими поверхностями имеет место разность потенциалов порядка 50 *мв*. Так как пластины расположены последовательно, а их около 200, в момент синхронного разряда между головным и хвостовым отделами рыбы образуется суммарная разность потенциалов порядка 10 *в*. Относительно незначительная амплитуда потенциала действия и ряд других, преимущественно морфологических и биохимических признаков, свидетельствуют о том, что у электрического ската пластины электрического органа — это гипертрофированные мионевральные пластины.

Наиболее развит электрический орган у электрического угря *Electrophorus electricus*, у которого он занимает значительную часть тела. Орган этот состоит, примерно, из 70 столбиков по 6000 и более отдельных пластин. Находясь на воздухе, т. е. когда разряд не шунтируется водой, крупный электрический угорь может развить короткий (длительностью до 3 *мсек*) импульс напряжением до 600 *в*, при максимальном пиковом значении тока порядка 1 А. Даже в воде мощность одного разряда значительно превышает 100 *ватт* (ток порядка 1/2 А, напряжение порядка 200—300 *в*). Потенциал покоя одной пластины этого вида электрических рыб порядка 90 *мв*, а потенциал действия достигает амплитуды 150 *мв*. Элементы этих органов — несомненно, видоизмененные мышечные волокна.

Проведение потенциала действия. Нервный аксон не может, естественно, рассматриваться ни как проводник первого, ни как проводник второго рода, если мы рассматриваем проведение потенциала действия вдоль по аксону. В состоянии покоя в аксоне имеется разность потенциалов между наружной и внутренней поверхностями фазы раздела — мембраны. Так как при этом все участки поверхности аксона изопотенциальны, вдоль аксона не могут протекать никакие токи, не может быть никакой электрической активности. Если же в одном из участков потенциал покоя изменится, немедленно возникает местный круговой ток. В месте деполяризации поверхности аксона возникает ток, направленный в аксон. Таким образом, перед волной возбуждения всегда оказывается несколько деполяризованный участок мембраны, так как этот ток разряжает емкость близлежащего участка мембраны.

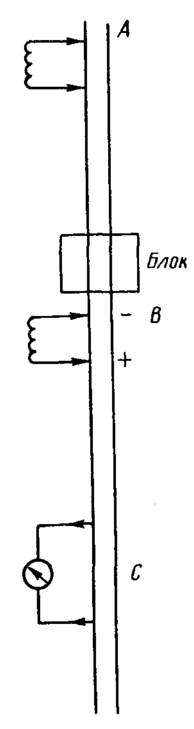


Рис. 84. Проведение потенциала действия в нерве, один участок которого заблокирован охлаждением.
Объяснение см. в тексте

Перемещение зарядов через мембрану в направлении, перпендикулярном направлению распространения потенциала действия по аксону, имеющее место при проведении потенциала действия, легко объяснить теми изменениями потоков натрия и калия, которые рассматривались выше. Так, после того, как возникший местный круговой ток деполяризовал мембрану покоящегося аксона на 15—20 *мв* (в случае гигантского аксона кальмара), резко повышается поток ионов натрия в клетку. Мембрана становится положительной изнутри. Таким образом, ближайший участок аксона вновь деполяризуется. Почему можно утверждать, что местные круговые токи способны возбудить соседние участки?

Если сильно охладить небольшой участок аксона с тем, чтобы вызвать блок проведения потенциала действия, а затем нанести максимальное раздражение в участке *A* (рис. 84), волна возбуждения дойдет до блока, а дальше не распространится. С другой стороны блока, в участке *B*, можно вновь раздражать нерв и вызвать проводимый в направлении *C* потенциал действия. Но раздражение в точке *B* можно отрегулировать так, чтобы оно оказалось подпороговым и не вызвало возникновения распространяющегося потенциала действия. При комбинированном раздражении в точках *A* и *B*, осуществляемом таким образом, чтобы момент нанесения подпорогового раздражения в точке *B* совпал со временем прихода волны возбуждения, вызванной надпороговым раздражением в точке *A* к границе блока прове-

дения, в точке *C* можно зарегистрировать нормальный потенциал действия. Этот потенциал действия возник в точке *B* в связи со сложением подпорогового импульса раздражения с электрической волной, бегущей впереди потенциала действия, распространению которого помешал холодовой блок.

Таким образом, впереди распространяющегося потенциала действия бежит волна электротонического потенциала, которая проводится вдоль по аксону, как по проводнику второго рода. Такая же волна возникает и распространяется с декрементом в результате нанесения подпорогового электрического раздражения в любом участке гигантского аксона. Для нее, естественно, холодовой блок препятствием не является. При сложении двух подпороговых стимулов в точке *B* возникает местная деполяризация, превысившая пороговую величину, в связи с чем здесь вновь появились круговые токи, достаточные для того, чтобы вызвать вышеописанные ионные токи, характерные для потенциала действия. Так представляется механизм распространения потенциала действия по безмякотному нервному волокну, например, головоногих моллюсков, где благодаря большой электрической емкости фазы раздела аксоплазмы и среды и относительно низкому сопротивлению цилиндрической аксоплазмы, скорость проведения потенциала действия вдоль по аксону пропорциональна диаметру аксона. В миелинизированных волокнах высокая скорость проведения потенциала действия обеспечивается другим механизмом, где имеет место так называемое скачкообразное проведение потенциала действия (рис. 85). Возбудимая мембрана обнажена только в перехватках Ранвье. Между перехватами поверхность аксона покрыта миелином, являющимся превосходным изолятором. Таким образом, описанные явления происходят, в основном, в перехватах Ранвье. Каждый последующий перехват деполяризуется в результате возникновения ионных токов в предыдущем перехвате. Проведение возбуждения становится поэтому не непрерывным, а скачкообразным. Это в значительной степени ускоряет проведение сигнала по нерву, несмотря на малый диаметр отдельных нервных аксонов.

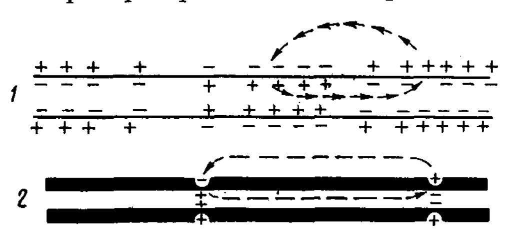


Рис. 85. Схема скачкообразного распространения волны возбуждения по миэлиновому нервному волокну (2) и безмякотному волокну (1)

Возможные причины изменений протоков ионов, приводящих к появлению потенциала действия. Все исследователи, исходящие из представлений о ведущей роли клеточной мембраны и локализованных в ней мембранных насосных механизмов, тесно

связанных с обменом веществ, естественно, в своих рассуждениях пытаются объяснять внезапное существенное увеличение потока ионов натрия в клетку, приводящее к появлению овершута потенциала действия, внезапным изменением проницаемости мембраны для этого вида ионов, т. е. к внезапному 500-кратному уменьшению сопротивления мембраны аксона головоногих моллюсков для тока ионов натрия в клетку. Однако в этом случае приходится предполагать, что такое повышение проницаемости мембраны для натрия кратковременно и что через определенный интервал времени, еще до окончательной нормализации проницаемости мембраны для ионов натрия, должно наступить повышение проницаемости мембраны для ионов калия, направление потока которых противоположно направлению потока ионов натрия. Лишь в этом случае может происходить вышеописанное уравнение потоков этих двух видов катионов, приводящее к восстановлению исходного значения потенциала покоя. Спрашивается, что же может приводить к таким внезапным и к тому же асинхронным изменениям сопротивления мембраны для катионов, имеющих один и тот же заряд и знак заряда? Одного временного прекращения работы «мембранного натриевого насоса» было бы недостаточно, чтобы увеличить поток ионов натрия через мембрану в 500 раз. Градиент концентрации ионов натрия через мембрану аксона кальмара, помещенного в морскую воду, для этого недостаточно велик. Некоторые авторы поэтому пытаются даже говорить о реверсии направления действия насоса.

Более реальным представляется другое объяснение. Исходя из упомянутых в первой части главы представлений о причинах несимметричного распределения ионов, можно было бы представить следующий механизм возникновения потенциала действия.

При покое клетки ионы калия избирательно взаимодействуют с фиксированными на макромолекулах структурных компонентов протоплазмы отрицательными зарядами. Свободный доступ ионы натрия (наравне с калием) имеют только в небольшой объем протоплазмы — так называемое свободнорастворяющее пространство. Если бы разность потенциалов на клеточной мембране отсутствовала, это количество пассивно распределяющихся между свободнорастворяющим пространством в клетке и внешней средой ионов калия и натрия сопровождалось бы эквивалентным ему количеством ионов хлора. Однако неравномерное избирательное накопление ионов калия протоплазмой в целом (благодаря избирательности структурных компонентов протоплазмы, т. е. полианионов к ионам калия) приводит, при наличии фазы раздела между протоплазмой и средой (мембраны), к установлению разности потенциалов через эту фазу раздела, по характеру своего происхождения аналогичной доннановской разности потенциалов. Ее величина определяется, в первую очередь, соотношением средних активностей ионов калия непосредственно у вну-

тренней и внешней границ мембраны. Поэтому под влиянием электрического поля, напряженность которого через мембрану по расчетам составляет 100 000 *в/см*, в свободнорастворяющем пространстве не будет эквивалентного количества пассивно распределяющихся между средой и свободнорастворяющим пространством катионов (натрий и калий) и анионов (хлор). Подвижные катионы, не взаимодействующие с недиффундирующими из клетки полианионами (т. е. только те, которые приурочены к свободнорастворяющему пространству), под влиянием электрохимического градиента через мембрану концентрируются в свободнорастворяющем пространстве, а ионы хлора, наоборот, выводятся из клетки.

Электрическая деполяризация клетки, предшествующая возникновению потенциала действия, очевидно, приводит к кратковременному исчезновению фактора, обеспечивающего избирательность полиэлектролитных структур протоплазмы к ионам калия. В связи с этим для ионов натрия становится доступным не только свободнорастворяющий объем клетки, а весь ее объем. Так как количество фиксированных отрицательных зарядов в клетке при этом не меняется, то по создавшемуся в результате потери избирательности градиенту концентрации для ионов натрия через мембрану последние устремляются в клетку, оставляя далеко позади себя ионы хлора, электрохимический градиент для которых через мембрану не изменился. Тут же неминуемо возникает двойной электрический слой, характерный для диффузионных разностей потенциалов. Величина этой разности потенциалов определяется разностью в подвижностях аниона и катиона, т. е. хлора и натрия, в данных конкретных условиях, и соотношением концентраций ионов натрия в среде и в клетке, причем последняя относится в данный момент уже ко всему ее объему. Таким образом, на потенциал покоя накладывается кинетический потенциал, возникший благодаря различной скорости тока ионов натрия и хлора в клетку. Усилившийся поток ионов натрия в клетку «закорачивает» потенциал покоя, обязанный своим происхождением неравномерному распределению ионов калия и хлора. Разность потенциалов на вершине овершута всецело определяется равновесным потенциалом по натрию еще и потому, что натрий движется по образовавшемуся для него электрохимическому градиенту, а хлор должен был бы двигаться по градиенту концентрации, но против соответствующего электрического градиента.

Для полного развития диффузионной разности потенциалов достаточно образоваться двойному электрическому слою, т. е. усилиться различию в подвижностях ионов натрия и хлора. Но для того чтобы ионы натрия достигли фиксированных в протоплазме отрицательных зарядов, к которым они в связи с выключением фактора избирательности имеют в данный момент доступ наравне с ионами калия, нужно время, требующееся для диффузии до этих мест. Ионы калия, служившие до этого в покоящейся

клетке, образно говоря, «привелегированными» противоионами фиксированных на структурных компонентах отрицательных зарядов, могут уступить место ионам натрия только после того, как последние достигли этих мест. Лишь после этого они, став излишними в условиях «равноправия» ионов калия и натрия, могут начать диффундировать в противоположном потоку ионов натрия направлении, т. е. через мембрану из клетки по своим градиентам. Во время овершута они двигаются по электрохимическому градиенту, а затем скорость их диффузии из клетки замедляется, так как после обратного перехода разности потенциалов на мембране через нуль они двигаются только по градиенту концентрации, но (в связи с постепенным восстановлением потенциала покоя) против электрического градиента. При постепенном восстановлении избирательности потоки ионов натрия в клетку замедляются. Затем, уже после достижения исходного значения потенциала покоя, в период окончательного установления исходных условий, по мере выхода поступившего в период возбуждения натрия из клетки, потоки ионов калия и натрия в противоположных, чем при возбуждении, направлениях синхронны и равны по величине; поэтому на данном этапе изменения разности потенциалов через мембрану практически не наблюдаются. Совершенно понятно (судя также и по рассчитанным на основе экспериментальных данных количествам ионов, проходящих через мембрану за время одного потенциала действия), что всеми этими процессами охватываются практически только ближайшие к мембране слои протоплазмы. Только в условиях опытов с искусственной фиксацией потенциала процессы эти могут охватывать более глубокие ее слои.

Отставание максимума потока ионов калия из клетки от максимума потока ионов натрия в клетку может быть отражением описанных переходных процессов. Такое представление согласуется с экспериментальными данными. Это дает известное право перенести «ответственность» за избирательное распределение ионов между покоящейся клеткой и средой и перераспределение этих ионов во время возбуждения на содержимое клетки, на всю протоплазму, а не только на мембрану с локализованными в ней биохимическими процессами. При таком понимании явлений несколько проясняется вопрос о том, каким образом обмен веществ связан с генерацией биопотенциалов и специфическим распределением ионов, воды и неэлектролитов между клеткой и средой. Эта трактовка требует еще многочисленных экспериментальных доказательств.

Из изложенного следует, что при изучении природы потенциала покоя и потенциала действия узловой проблемой является выяснение механизма избирательного накопления ионов калия, по сравнению с ионами натрия, в цитоплазме покоящихся клеток.

ГЛАВА IX
ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ

КЛАССИФИКАЦИЯ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИХ ЯВЛЕНИЙ

К электрокинетическим явлениям относят движение фаз гетерогенной системы под влиянием наложенного на нее постоянного электрического поля, а также образование разности потенциалов в системе при механическом движении фаз.

В связи с тем, что клетки и ткани биологических объектов представляют собой сложные гетерогенные коллоидные системы, изучение электрокинетических явлений, протекающих в этих системах, представляет большой интерес при физико-химических исследованиях структур биосубстратов и клеточных поверхностей.

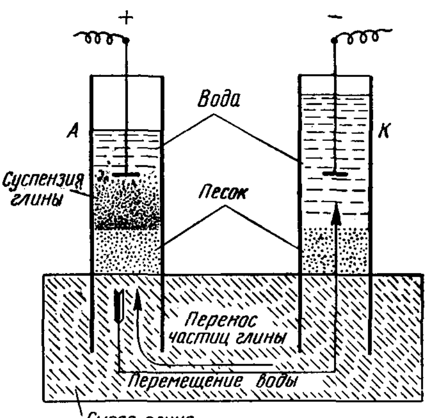


Рис. 86. Схема опыта Рейса

На схеме видно, что под влиянием электрического поля в анодной трубке над песком появляется муть, состоящая из частиц глины. Частицы глины, заряженные отрицательно, передвигаются в сторону положительного электрода. Уровень воды в анодной трубке понизился. В катодной трубке муть не появляется

Электрокинетические явления впервые обнаружил профессор Московского университета Ф. Рейс, установивший в 1807 г. возможность передвижения в постоянном электрическом поле дисперсной фазы и дисперсионной среды коллоидных растворов (рис. 86).

Так были открыты два электрокинетических явления — электрофорез и электроосмос.

Электрофорез — это движение частиц дисперсной фазы в постоянном электрическом поле по направлению к противоположно заряженному электроду.

Электроосмос — движение дисперсионной среды в постоянном электрическом поле по направлению к электроду, заряженному одноименно с частицами дисперсной фазы.

В дальнейшем было обнаружено, что в коллоидных растворах при наличии разности гидростатического давления или градиента силы тяжести между дисперсной фазой и дисперсионной средой

может возникать разность потенциалов. Эти потенциалы получили название: потенциалы течения (протекания) и потенциалы седиментации (оседания).

Потенциалы течения впервые обнаружил в 1859 г. немецкий исследователь Квинке (Quinke). Они возникают в результате движения жидкости через капилляры или поры пористой перегородки под влиянием разности гидростатического давления.

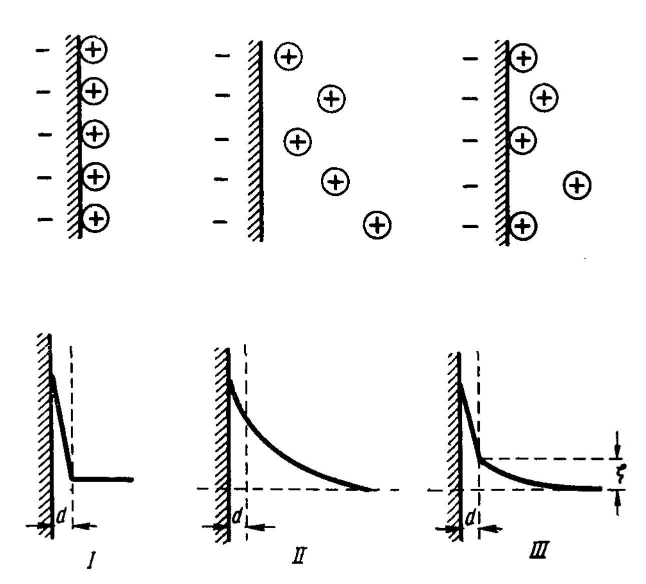


Рис. 87. Схема двойного электрического слоя. Вверху обозначено расположение ионов, внизу — кривые падения потенциала: I — по Гельмгольцу; II — по Гуи; III — по Штерну; *d* — адсорбционный слой

Потенциалы седиментации впервые описал в 1878 г. немецкий исследователь Дорн (Dorn). Потенциалы седиментации могут возникать в гетерогенной среде под влиянием силы тяжести между верхними и нижними слоями системы.

На основании изложенного следует, что потенциалы седиментации и течения представляют собой явления, обратные электрофорезу и электроосмосу [1]. Все электрокинетические явления так или иначе связаны с возникновением разности потенциалов, возникающей между дисперсной фазой и дисперсионной средой. Такой потенциал называется электрокинетическим, или дзета-потенциалом (ζ-потенциал). Электрокинетический потенциал

---

[1] Наибольшее применение в биологическом эксперименте нашли методы электрофореза (см. стр. 286).

возникает только вследствие движения фаз гетерогенной системы; разность потенциалов образуется на границе между тончайшей водяной пленкой (так называемый адсорбционный слой или адсорбционная пленка), которая адсорбирована каждой взвешенной частицей и всей остальной массой жидкости (рис. 87).

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

Возникновение потенциала на границе двух фаз всегда связано с наличием на поверхности раздела электрического заряда. Причины возникновения заряда на границе раздела фаз могут быть различными. Электрический заряд на поверхности клеток и биосубстратов возникает в ряде случаев в результате адсорбции ионов на поверхности частиц, которые сами не способны образовывать ионы (неионогенные частицы), а также может образоваться за счет ионизации диссоциирующих групп дисперсной фазы. Возникновение зарядов на неионогенных поверхностях (например, масла, целлюлоза, холестерин и др.) принципиально возможно за счет адсорбции как катионов, так и анионов, однако преимущественно адсорбируются анионы. Объясняется это тем, что анионы менее гидратированы, чем катионы, и поэтому для удаления анионов из раствора и их последующей адсорбции на поверхности раздела требуется меньшая затрата энергии. Возникновение поверхностного заряда за счет ионизации может, например, происходить в белках и других органических электролитах, содержащих карбоксильные, гидроксильные, аминные и другие полярные группы.

В результате ионизации этих групп одни ионы (так называемые противоионы) уходят в дисперсионную среду, а другие (потенциалообразующие ионы) остаются фиксированными на поверхности частиц дисперсной фазы и оказываются ответственными за знак ее потенциала.

Так, в белковых молекулах возникновение заряда на поверхности зависит от кислотных и щелочных группировок. Кислотные группировки белка происходят, главным образом, за счет карбоксильных групп дикарбоновых аминокислот. Кислой реакцией обладают также фенольные гидроксилы и сульфгидрильные группы. Щелочной реакцией — аминные, гуанидиновые и иминные группы диаминокислот. На кислотно-щелочные свойства белка влияет также характер соединения остатков аминокислот в белковой молекуле.

Благодаря наличию одновременно кислотных и щелочных групп, белки представляют собой биполярные ионы:

$$R\langle\begin{matrix}NH_2\\COOH\end{matrix} \longrightarrow R\langle\begin{matrix}NH_3^+\\COO^-\end{matrix}$$

В кислых растворах белок играет роль катиона. Например, при действии соляной кислоты образуется протеин — хлорид.

$$R\begin{cases}NH_3^+\\COO^-\end{cases} + HCl \rightarrow R\begin{cases}NH_3^+\\COOH\end{cases} + Cl^-$$

Биполярный ион белка — Катион белка — Противоион

Таким образом возникает потенциалообразующий ион группы NH_3^+ и противоион Cl^-. В щелочных растворах образуется анион белка. Например, с едким натром белок образует протеинат натрия.

$$R\begin{cases}NH_3^+\\COO^-\end{cases} + NaOH \rightarrow R\begin{cases}NH_2\\COO^-\end{cases} + Na^+ + H_2O$$

Биполярный ион белка — Анион белка — Противоион

Возникновение заряда на поверхности белка в щелочной среде связано с диссоциацией карбоксильной группы и с возникновением отрицательно заряженных потенциалообразующих ионов (карбоксила) и положительно заряженных противоионов.

Как известно, диссоциация белков зависит от их изоэлектрической точки.

Для большинства белков изоэлектрическая точка слегка сдвинута в кислую сторону. Некоторые белки (например, протамины и гистоны) имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной реакции, так как такие белки относительно богаче аминными группами и в своем составе содержат больше остатков диаминокислот. В нейтральном растворе протамины и гистоны являются слабыми основаниями.

Итак, наличие заряда на поверхности разделов двух фаз обусловлено асимметрическим распределением ионов. Ионы одного знака прочно связаны поверхностью частиц, а ионы противоположного знака находятся в дисперсионной среде. *Такая система ионов, в целом электрически нейтральная, называется двойным электрическим слоем.*

Структура двойного электрического слоя не зависит от механизма возникновения заряда на поверхности частицы: происходит ли образование заряда путем диссоциации ионогенных групп молекул или за счет преимущественной адсорбции ионов из раствора. Структура двойного электрического слоя зависит от плотности расположения зарядов на поверхности частицы. При редком расположении зарядов на поверхности частицы вокруг каждого заряда в растворах возникает ионная атмосфера. В случае плотного расположения зарядов обобществление ионных атмосфер образует структуру истинного двойного слоя.

Представление о двойном электрическом слое подвергалось значительным изменениям на протяжении всей истории изучения электрокинетических потенциалов.

Согласно наиболее старым представлениям, которые выдвинул еще Гельмгольц в 1867 г., двойной электрический слой образован двумя противоположно заряженными слоями, каждый из которых состоит из ионов одного знака и находится один от другого на расстоянии средней величины радиуса входящих в него ионов (см. рис. 87).

В результате действия сил электростатического притяжения противоионы стремятся расположиться возможно ближе к ионам, адсорбированным на поверхности частицы. Таким образом, двойной электрический слой, по Гельмгольцу, представляет собой конденсатор, обкладки которого состоят из ионов противоположного знака. Ионы как одного, так и другого знака прочно и неподвижно фиксированы и поэтому двойной слой, согласно представлению Гельмгольца, должен иметь постоянную жесткую структуру.

Разность потенциалов между твердой фазой и раствором (E) в рассмотренном случае может быть выражена в виде уравнения:

$$E = \frac{4\pi l \sigma}{D}, \qquad (9.1)$$

где l — расстояние между слоями,

σ — заряд на единицу поверхности,

D — диэлектрическая постоянная.

Таким образом, по Гельмгольцу, не должно быть различия между величиной полной разности потенциалов, возникающей между двумя фазами (термодинамический потенциал) и величиной скачка потенциала на границе раздела двух фаз (электрокинетический или дзета-потенциал). Падение потенциала, по этой теории, происходит на очень малом расстоянии, равном средней величине ионного радиуса, и поэтому происходит очень резко (см. рис. 87).

Исходя из того, что двойной электрический слой имеет жесткую структуру, его толщина, согласно теории Гельмгольца, не должна зависеть от общего количества ионов, находящихся в растворе, и от их валентности, т. е. от ионной силы раствора, количественное выражение которой представляет собой полусумму произведений величины зарядов ионов, содержащихся в растворе, на квадрат заряда ионов, т. е.

$$\mu = c\,\frac{\Sigma n Z^2}{2}, \qquad (9.2)$$

где μ — ионная сила,

c — молярная концентрация,

n — число ионов, составляющих молекулу,

Z — заряд иона.

Представления Гельмгольца о двойном электрическом слое справедливы только для разбавленных растворов и представляют собой лишь частный случай более общей теории, которую в дальнейшем развили Гуи (Gouy) (1910), О. Штерн (1924), А. Н. Фрумкин (1929) и Б. В. Дерягин (1935—1941).

Гуи впервые заметил, что противоионы не находятся в фиксированном состоянии, а пребывают в неупорядоченном тепловом движении. Однако помимо неупорядоченного теплового движения, противоионы подвергаются притяжению потенциалообразующими ионами, находящимися на поверхности частицы. В результате взаимодействия этих двух сил — теплового движения и электрического притяжения, устанавливается равновесие, при котором плотность распределения ионов около поверхности частицы будет убывать с увеличением расстояния от поверхности твердой фазы по закону распределения Больцмана. Заряд поверхности частицы может быть рассчитан по следующему уравнению:

$$\varepsilon = \sqrt{\frac{DRT}{2\pi}}\, c \left(e^{\frac{F\varphi}{2RT}} - e^{-\frac{F\varphi}{2RT}}\right), \qquad (9.3)$$

где D — диэлектрическая проницаемость,
F — заряд одного *г-экв*,
φ — полная разность потенциалов между твердой фазой и раствором,
R — газовая постоянная.

Выражение $e^{\frac{F\varphi}{RT}}$ относится к распределению положительных ионов, а $e^{-\frac{F\varphi}{RT}}$ — к распределению отрицательных ионов.

Таким образом, по Гуи, двойной электрический слой имеет структуру диффузного двойного слоя (рис. 87, II). Толщина этого слоя составляет, например, в 0,001 н. растворе KCl — 10 *мμ*, а в 0,1 н. растворе — 1 *мμ*.

Теория Гуи, также как и Гельмгольца, представляет лишь частный случай более общей теории, которая была разработана в XX веке.

По современным представлениям (О. Штерн, А. Н. Фрумкин, Б. В. Дерягин), часть ионов находится на молекулярном расстоянии от поверхности частицы, образуя плотный гельмгольцовский двойной электрический слой. Такой слой, состоящий из потенциалообразующих ионов и некоторой части противоионов, удерживающихся на поверхности частицы силами специфической адсорбции, перемещается в электрическом поле вместе с частицей и адсорбированным на ней слоем жидкости, так называемым адсорбционным слоем. Другая часть противоионов, не находящаяся в адсорбционном слое, остается в дисперсионной среде, образуя так называемый диффузионный слой (рис. 87, III).

Если бы коллоидная частица передвигалась без части противоионов, то электрокинетический потенциал соответствовал бы полной разности потенциалов между поверхностью частицы и дисперсионной средой, т. е. обычно определяемому в электрохимии полному или термодинамическому потенциалу φ_a. На самом деле, противоионы, находящиеся в адсорбционном слое, увлекаются вместе с коллоидной частицей, поэтому электрокинетический потенциал частицы возникает на границе адсорбционного и диффузионного слоев и составляет лишь часть термодинамического потенциала. При уменьшении концентрации ионов толщина диффузионного слоя возрастает и структура двойного электрического слоя приближается к структуре слоя Гуи. При повышении концентрации ионов толщина диффузионного слоя уменьшается и структура двойного слоя приближается к структуре двойного слоя, предложенного Гельмгольцем. Знак потенциала определяется знаком потенциалообразующих ионов, а величина его пропорциональна разности числа потенциалообразующих ионов и противоионов, входящих в состав адсорбционного слоя.

Из изложенного следует, что любые факторы, влияющие на величину двойного электрического слоя, изменяют величину электрокинетического потенциала. Электрокинетический потенциал образуется в очень тонком слое жидкости, непосредственно прилегающем к дисперсной фазе и притом в направлении, перпендикулярном к направлению движения фазы (или среды). В связи с этим ζ-потенциал нельзя зарегистрировать непосредственно с помощью электродов. Величину ζ-потенциала можно рассчитать только косвенно, измеряя скорость движения фазы в электрическом поле по следующей формуле (по Смолуховскому):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta u}{DE}, \qquad (9.4)$$

где ζ — дзета-потенциал (электрокинетический потенциал),
η — коэффициент вязкости дисперсионной среды,
u — скорость передвижения фазы,
D — диэлектрическая проницаемость,
E — градиент потенциала внешнего электрического поля.

Зная напряженность внешнего поля, диэлектрическую проницаемость и коэффициент вязкости среды и определив опытным путем скорость передвижения дисперсной фазы, вычисляют величины электрокинетического потенциала.

Согласно формуле Смолуховского, электрофоретическая скорость передвижения фазы (частицы) не зависит от размеров и формы частицы.

Однако, как это показал Генри, формула Смолуховскго (9.4) справедлива в тех случаях, когда размеры частицы (ее радиус) значительно превышают толщину двойного электрического слоя,

составляющую в среднем величину около 10^{-8} *см*. Таким образом, формула Смолуховского полностью приемлема для лейкоцитов, эритроцитов, микроорганизмов и других клеток и не применима для молекулярных частиц.

Экспериментально показано, что различные объекты биологического и небиологического происхождения, обладая одной и той же величиной потенциала, движутся в электрическом поле одной и той же напряженности с одинаковой скоростью. В зависимости от знака и величины заряда объектов меняются направление и скорость их движения.

Почему же скорость электрофоретического движения не зависит от формы и размеров самой движущейся частицы? Дело в том, что с увеличением поверхности частицы ее общий заряд возрастает обычно в той же мере, как и встречаемое ею сопротивление жидкости.

Для белковых молекул и небольших по размерам частиц, радиус которых сравним с толщиной двойного электрического, слоя, электрофоретическая подвижность зависит как от формы так и от размеров частиц.

Электрокинетический потенциал рассчитывается в этих случаях по формуле Дебая и Гюккеля:

$$\zeta = k\,\frac{\pi\eta u}{DE}\,. \qquad (9.5)$$

Формула Дебая и Гюккеля отличается от формулы Смолуховского тем, что в уравнение введен коэффициент k, меняющийся в зависимости от формы и размеров частиц. Для малых сферических частиц $k = 6$. При выражении ζ-потенциала в вольтах и проведении электрофореза в воде при 18° С, при $E = 1$ *в/см*, а подвижности в *мк/сек*, уравнение (9.5) примет следующий вид:

$$\zeta = 140u. \qquad (9.6)$$

Как видно из приведенной формулы (9.5), величина электрокинетического потенциала определяется вязкостью среды, диэлектрической постоянной фаз и скоростью движения частиц.

Из уравнения (9.6) видно, что скорость движения частицы при равных условиях проведения электрофореза зависит от величины ее заряда. В свою очередь, величина заряда частицы определяется природой самой частицы, а также от находящихся в растворе ионов. Ионы дисперсионной среды сильно влияют на величину и знак заряда частиц благодаря, главным образом, способности адсорбироваться на поверхности частицы.

Так, водородные и гидроксильные ионы вследствие большой адсорбционной способности оказывают большое влияние на ζ-потенциал. Большой адсорбционной способностью обладают слож-

ные органические ионы алкалоидов и красителей; среди катионов сильнее всего адсорбируются двух-трехвалентные ионы тяжелых металлов.

На величину электрокинетического потенциала оказывает влияние концентрация добавленных ионов. Добавление в дисперсионную среду ионов противоположно заряженных частиц приводит к тому, что ионная атмосфера, окружающая поверхность частицы, сжимается, становится более плотной, все большее количество противоионов при этом переходит в адсорбционный слой. Таким образом, происходит снижение величины ζ-потенциала поверхности частицы. По мере добавления электролитов можно добиться значительного снижения толщины диффузного слоя при этом двойной электрический слой приобретает структуру, близкую к гельмгольцевскому.

Добавление большой концентрации многовалентных ионов может вызвать даже перезарядку частиц, т. е. изменение знака потенциала на противоположный.

Как показали А. Н. Фрумкин и Б. В. Дерягин, увеличение содержания электролитов в растворе способно уменьшить двойной электрический слой, но не уничтожить его, так как на расстоянии порядка 10^{-8} *см* от поверхности коллоидной частицы остается ионная обкладка, состоящая, по крайней мере, из одного слоя ионов. Такая незначительная толщина двойного слоя не может помешать адсорбции противоионов из электролита на поверхности частицы и не может препятствовать столкновению и агрегации частиц.

Электрический заряд поверхности частиц играет большую роль в поддержании стабильности взвесей коллоидов, устойчивости суспензии эритроцитов, бактериальных и других клеток. Обычно поверхность живых клеток имеет отрицательный заряд, величина которого в ряде случаев зависит от количества адсорбированных на их поверхности молекул или ионов. Адсорбция ионов зависит от структуры поверхности коллоидов и клеток. Известно, что различные живые клетки имеют отрицательный заряд на поверхности.

Отрицательный заряд многих живых клеток в значительной мере обусловлен и ионогенными группами фосфолипидов, входящих в состав клеточных оболочек. Добавление к клеточной суспензии катионов приводит к тому, что величина заряда клеток снижается, а клеточные суспензии теряют стабильность так же, как и коллоидные растворы. Толщина диффузионного слоя, окружающего коллоидные частицы, при этом снижается, величина заряда коллоидов может упасть до минимума. При этом величина заряда достигает изоэлектрической точки. Дальнейшее добавление катионов может вызвать перезарядку частиц. Добиться перезарядки живых клеток нельзя, так как при потере заряда клетки погибают.

Электрокинетический потенциал коллоидов и клеточных поверхностей может быть измерен при помощи различных методов, применяемых для измерения потенциала любых дисперсных систем.

Однако наиболее широкое применение для определения электрокинетического потенциала биологических объектов получили методы электрофореза.

МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ

Обычно применяют два основных метода — макро- и микроскопический электрофорез.

Макрометод в большинстве случаев используют для разделения веществ, находящихся в смеси, и препаративного их выделения.

Микрометод используют для изучения подвижности клеток и частиц в электрическом поле, величины электрокинетического потенциала, а также электрохимических свойств поверхности исследуемых объектов.

Макрометоды электрофореза

Для измерения скорости электрофореза при помощи макрометода часто применяют *U*-образный сосуд, на дно которого помещают исследуемую дисперсную систему, а в боковые колена приливают буферный раствор. При помещении в сосуд дисперсной фазы и дисперсионной среды между ними образуется граница раздела. Под влиянием электрического поля эта граница смещается в боковых коленах в направлении либо анода, либо катода. Как упоминалось выше (см. стр. 277, рис. 86), подобные эксперименты проводил Ф. Рейсс, впервые наблюдавший явления электрофореза и электроосмоса. В дальнейшем этот метод совершенствовался в следующих главных направлениях: 1) делались попытки стабилизировать границу раздела фаз; 2) улучшались методы регистрации скорости передвижения фаз (от визуальной оценки до оптических методов); 3) разрабатывались методы препаративного электрофореза.

Макрометод электрофореза получил особенно широкое распространение со времени разработки техники электрофореза сложных смесей белков и других веществ Тизелиусом (A. Tiselius).

Аппарат Тизелиуса состоит из *U*-образной камеры, состоящей из трех разборных частей, которые плотно примыкают друг к другу (рис. 88).

При подготовке к электрофорезу нижнюю часть камеры (рис. 89) заполняют исследуемым раствором (например, белка).

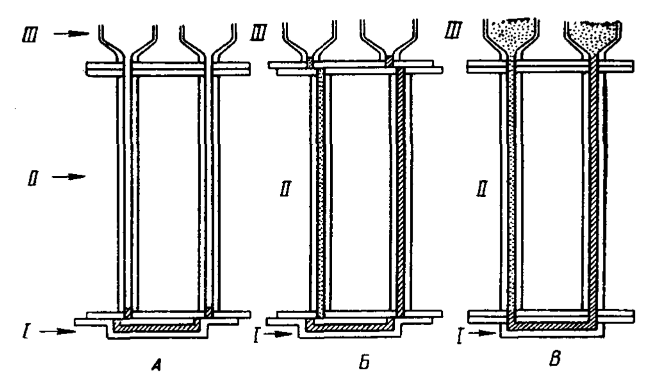


Рис. 88. Камера, употребляемая в электрофоретическом аппарате Тизелиуса. Камера состоит из трех частей (см. в тексте). *А* и *Б* — камеры в состоянии сборки; *В* — в собранном, готовом к работе виде. Исследуемый раствор обозначен штриховкой

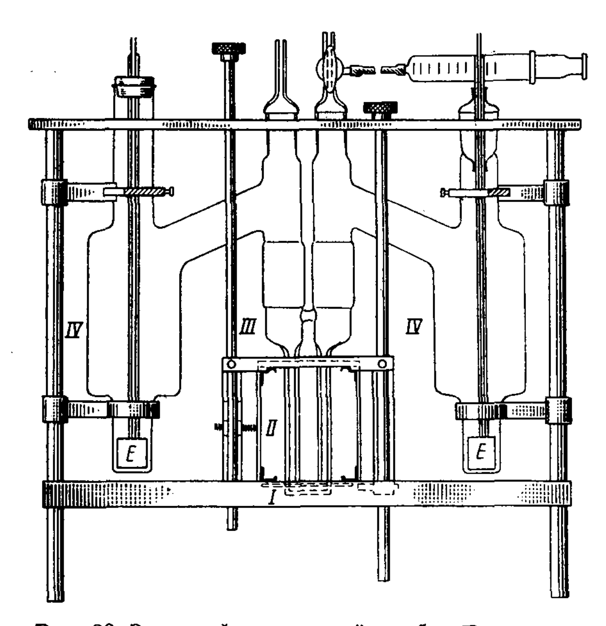


Рис. 89. Электрофоретический прибор Тизелиуса: I, II, III — части электрофоретической камеры; IV — сосуды для помещения электродов (*E* — электроды)

Исследуемый раствор помещают также в одну ветвь второй части камеры, а другую ветвь заполняют буферным раствором. (рис. 88 и 89, II). Перед заполнением растворами исследуемый раствор белка диализируют в буферном растворе, так как буферный и соприкасающиеся с ним растворы должны иметь одинаковую концентрацию и отличаться друг от друга лишь по содержанию исследуемого вещества.

Исследуемый раствор и наслаиваемый буферный раствор предварительно строго выравнивают по pH, электропроводности и ионной силе. После заполнения сосудов камеру собирают, помещают

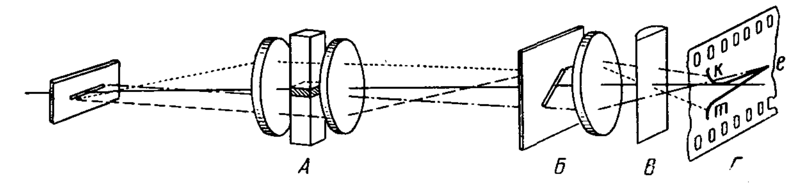


Рис. 90. Схема оптической регистрации, используемой при электрофорезе.

Объяснение см. в тексте

в водяную баню с постоянной температурой (+2,+4° С) и присоединяют к электродам, помещенным в специальные большие сосуды с буферным раствором.

Как видно из рис. 89, электроды *Е* вынесены далеко от исследуемого раствора с целью предупреждения загрязнения раствора.

Электрофорез проводится при высоком падении потенциала 8—10 *в/см* для более четкого разделения фаз по их электрофоретической подвижности.

Передвижение белка в камере аппарата Тизелиуса регистрируют по изменению показателя преломлений в вертикальных ветвях камеры (с плоскопараллельными стенками).

Регистрация показателя преломления производится с помощью длиннофокусной оптики (рис. 90). В ветви камеры *А* находится исследуемое вещество (обозначено штриховкой).

В связи с тем, что показатель преломления у исследуемого вещества больше, чем в среде, проходящий через него луч (штрих-пунктирная линия) отклонится к нижней части косой щели *Б* и затем пройдет не в фокусе цилиндрической линзы *В*, а отклонится в точку *е* фотопленки *Г*. Тот луч, который проходит через чистый буферный раствор (при отсутствии исследуемого вещества), направляется к верхней части косой щели (пунктирная и штриховая линии), а потом к точке *k* (или *m*) фотопленки. Результат измерений непосредственно получается в виде кривой *kem*.

Метод Тизелиуса имеет большое значение для клинических исследований белков плазмы крови (рис. 91). На аппарате Тизе-

лиуса можно получать результаты высокой точности, однако он представляет собой сложный и громоздкий прибор.

В последние годы широко применяется также менее точный, но значительно более портативный и простой в лабораторных исследованиях метод электрофореза на бумаге. Этот метод был введен Виландом и Фишером (H. Wieland a. Fischer) и позволяет разделять белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, жирные кислоты, стерины и другие биологически важные вещества. Метод заключается в том, что на специальной фильтровальной бумаге, смоченной буферным раствором, под действием постоянного электрического поля происходит передвижение исследуемых веществ, электрофоретическая подвижность которых бывает различной для разных компонентов смеси. В связи с этим компоненты смеси могут быть отделены друг от друга. На рис. 92 изображена схема одной из модификаций аппарата для электрофореза на бумаге. На фильтровальную бумагу, находящуюся в центральной части аппарата, наносят исследуемую смесь в небольшом количестве (0,01—0,04 *мл* раствора в буфере). Фильтровальная бумага соприкасается с электродными растворами. На рис. 92 видно,

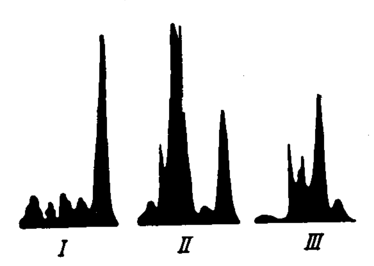


Рис. 91. Диаграмма электрофоретического анализа по Тиселиусу: I — нормальная сыворотка; II — плазма крови при множественной миэломе; III — сыворотка при нефрозе

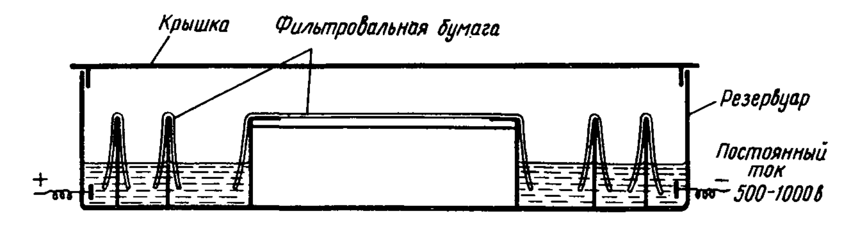


Рис. 92. Аппарат для электрофореза на бумаге

что буферные растворы помещаются в нескольких камерах, связь между которыми осуществляется посредством бумажных лент, смоченных буферным раствором.

При помощи таких камер изменения pH полей анода и катода после включения тока не влияют на бумагу с исследуемым веществом. Электрофорез производится при падении потенциала около 15—20 *в/см* и силы тока в 3—5 *ма*. В момент электрофореза аппарат держится в закрытом состоянии во избежание испарения буферного раствора.

По окончании опыта (электрофорез длится несколько часов) исследуемые вещества в зависимости от величины электрофоретической подвижности перемещаются от линии нанесения («линии старта») на различные расстояния. Ленту фильтровальной бумаги с веществами высушивают и окрашивают красителем, проявляющим исследуемые вещества. В дальнейшем разделенные компоненты исследуют на их процентное содержание с помощью фотометрирования (рис. 93).

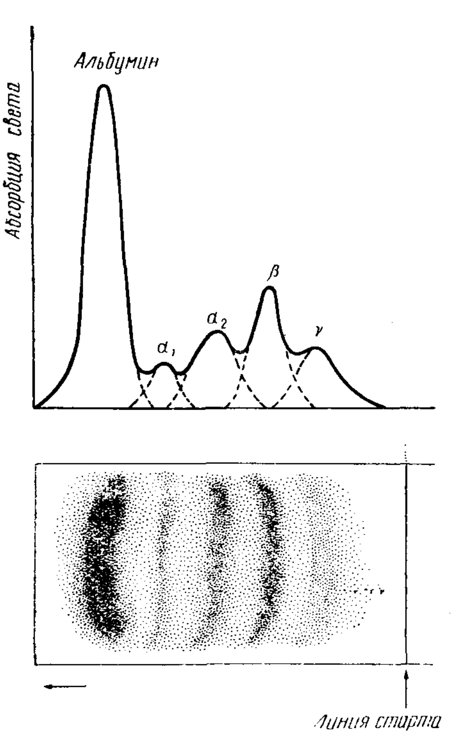


Рис. 93. Электрофорез на бумаге: внизу — окрашенная бумажная лента после электрофореза сыворотки; наверху — величина абсорбции света вдоль бумажной полосы показывает количественное соотношение отдельных компонентов; α_1, α_2, β, γ — фракции глобулинов

Для измерения электрокинетического потенциала поверхности микроскопически видимых частиц суспензий, бактериальных клеток, эритроцитов и других клеточных взвесей значительно более пригодны микрометоды.

Микрометод электрофореза

Микрометод электрофореза заключается в измерении скорости переноса клеток в электрическом поле в специальных камерах под микроскопом.

Предложено много различных типов электрофоретических камер, в которых перемещение клеток регистрируется с помощью окулярного микрометра. Обычно электрофорез проводится при силе тока в 3—4 *ма* и напряжении 80—100 *в* в простых стеклянных камерах (рис. 94). Зная скорость движения частицы в электрическом поле, рассчитывают электрокинетический потенциал по формуле (9.5). Однако необходимо всегда учитывать, что на электрофоретическую подвижность клеток влияет электроосмос, т. е. движение жидкости в противоположном электрофорезу направлении. В замкнутых кюветах возникает циркуляция жидкости около стенок в одном направлении и в центре камеры — в противоположном.

В связи с этим на различных уровнях камеры скорость движения частицы будет разная и в формулу (9.5) необходимо внести поправки. А. А. Смолуховский вывел зависимость скорости движения частицы от глубины камеры и установил, что истинная скорость электрофореза частицы составляет среднее значение скоростей по всей плоскости поперечного сечения камеры. Однако такие расчеты передвижения частиц на различных уровнях камеры

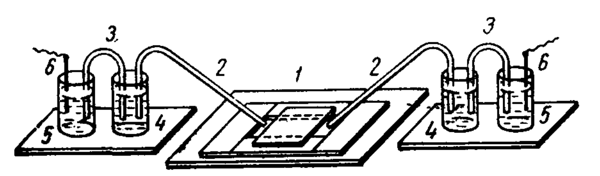


Рис. 94. Общий вид установки для микроэлектрофореза:

1 — камера для электрофореза, сделанная из предметного и покровного стекол, *2* — агаровые сифоны, *3* — агаровые соединительные трубки, *4* — стаканчики, наполненные насыщенным раствором KCl, *5* — стаканчики, наполненные 10%-ным раствором $CuSO_4$, *6* — медные электроды

сложны. Смолуховский показал, что истинную скорость электрофореза частиц можно вычислить по скоростям движения частиц, измеренным на двух глубинах — в среднем слое камеры и на одной шестой ее глубины, тогда

$$V_{\text{ист}} = \frac{3}{4} V_{1/6} + \frac{1}{4} V_{1/2}, \tag{9.7}$$

где $V_{\text{ист}}$ — истинная скорость электрофореза частицы,

$V_{1/6}$ — скорость частицы на $^1/_6$ глубины камеры,

$V_{1/2}$ — скорость частицы на $^1/_2$ глубины камеры.

Можно также производить измерения скорости частицы в том слое камеры, где движение воды практически отсутствует и, следовательно, наблюдаемая скорость частицы равна скорости электрофореза. Этот слой в камере лежит, согласно расчетам Смолуховского, на глубине 0,211 (считая от ее дна или же от ее поверхности), т. е. приблизительно на 1/15 глубины камеры.

С помощью методов микроэлектрофореза получены важные данные, характеризующие электрохимические свойства плазматических оболочек или каких-либо других биологических поверхностей.

Было показано, что одни клетки обладают стабильными показателями величины электрокинетического потенциала, в то время как другие обнаруживают значительные колебания ζ-потенциала от изменений условий среды и других воздействий. Так, электрофоретическая подвижность интактных эритроцитов одного и того же вида животных обнаруживает постоянную величину при различных заболеваниях крови, в том числе и при многих формах

анемий, когда наблюдаются резкие патологические изменения эритроцитов и содержания в них гемоглобина.

Более того, электрокинетический потенциал эритроцитов сохраняет свою величину после полного гемолиза, вызванного сильными гемолизинами (табл. 13).

Таблица 13

Влияние сапонина на скорость электрофореза и гемолиз эритроцитов

Концентрация сапонина (в молях)	Скорость (*в мк/сек*) при $F=1$ *в/см*)	Состояние эритроцитов
0	1,08	Гемолиза нет
10^{-5}	1,09	—»—
10^{-4}	1,09	—«—
10^{-3}	1,07	—»—
10^{-2}	1,16	Гемолиз
10^{-1}	1,09	—»—

Можно сказать, что электрохимические свойства поверхности эритроцитов отличаются большой стойкостью и постоянством.

Кроме того, было обнаружено, что ζ-потенциал эритроцитов не зависит от изменения концентрации сывороточных белков и сохраняет ту же величину, что и интактные эритроциты.

В связи с этими данными можно считать, что электрокинетический потенциал поверхности эритроцитов определяется собственным зарядом поверхности и протеины на поверхности неповрежденных эритроцитов не сорбируются. В том случае, когда происходит изменение физико-химического состава самой поверхности клетки, величина ζ-потенциала изменяется. Так у животных, которым предварительно вводили пирогенные вещества (продукты белкового распада из гнойных плевральных эксудатов или из мочи больных лейкемией, липосахариды патогенных микроорганизмов и др.), а также при некоторых заболеваниях, например лимфосаркоме, гемобластозах, величина электрокинетического потенциала может претерпевать значительные изменения.

Характерным показателем физико-химических свойств поверхности клетки является ее изоэлектрическая точка, которая может быть измерена также методом электрофореза. Известно, что изоэлектрическая точка поверхности эритроцита низкая и находится при pH около 1,7. При длительных измерениях электрофореза (особенно в кислых растворах) в результате повреждения могут измениться физико-химические свойства поверхности эритроцита и за счет адсорбции белков на поврежденных эритроцитах величина электрокинетического потенциала может измениться. Низкое значение изоэлектрической точки эритроцитов не соответствует изоэлектрической точке ни гемоглобина (pH 6,8), ни белков (pH 4,7), а также липоидов (pH 2,6), выделенных из эритроцитов.

Изучая зависимость электрокинетического потенциала от величины pH дисперсионной среды и принимая во внимание химический состав эритроцитов, некоторые авторы высказали предположение, что ζ-потенциал этих клеток обусловлен сильно диссоциирующими кислотными группами, главным образом, за счет ориентированных фосфатных групп молекул кефалина на поверхности эритроцитов.

Из изложенного следует, что стойкий электрокинетический потенциал эритроцитов зависит от собственного заряда поверхности клеток (главным образом, за счет ионизации диссоциирующих групп фосфолипидов), а не связан с процессами адсорбции белков.

Колебания величины электрокинетического потенциала в зависимости от различных внешних воздействий наблюдаются у различных бактериальных клеток. Это объясняется тем, что бактерии обладают способностью адсорбировать на своей поверхности белки, а также другие органические вещества. Так, при наличии в питательной среде яичного альбумина, желатины сывороточных белков, а также продуктов распада отмерших микроорганизмов эти вещества легко адсорбируются на поверхности клетки и сообщают ей ту же электрофоретическую подвижность, которая свойственна им самим. Высокая адсорбционная способность бактерий так же, как и других биологических объектов, зависит от химического состава и структуры поверхности клеток. Благодаря изучению зависимости величины электрофоретической подвижности бактериальных клеток от изменения pH среды большинство микроорганизмов удалось разделить на две группы. К одной группе принадлежат микроорганизмы, поверхность которых имеет белковую природу. Ионизация диссоциирующих групп таких поверхностей обусловливает заряд клетки, который меняется в зависимости от изменения pH среды.

Ко второй группе относят бактерии, заряд поверхности которых обусловлен полисахаридами, активно адсорбирующими ионы из дисперсионной среды. Подвижность таких клеток практически не зависит от колебаний величины pH суспензий. Однако часто такое деление бактерий оказывается условным в связи с тем, что в зависимости от условий культивирования и различных внешних воздействий у одного и того же вида бактерий можно изменять электрохимические свойства поверхности клетки.

Например, в обычных условиях культивирования подвижность золотистого стафилококка остается постоянной в широком диапазоне изменений pH. Если же золотистый стафилококк культивировать на среде, богатой глюкозой, то обнаруживается зависимость электрофоретической подвижности клеток от pH, что является, по мнению многих авторов, следствием накопления на поверхности клеток ионогенных групп белковой природы.

При измерении ζ-потенциала большую роль играет стабильность клеточных суспензий, благодаря которой клетки удерживаются во взвешенном состоянии.

Стабильность клеточных суспензий так же, как и коллоидов, зависит от ионного состава среды. Присутствие в дисперсионной среде зарядов, имеющих одинаковый знак с потенциалообразующими ионами поверхности клеток, препятствует сближению клеток, их агглютинации и удерживает клетки во взвешенном состоянии в растворе. Однако стабильность суспензий осуществляется часто не только зарядом поверхности клеток и частиц, но и наличием гидратной оболочки вокруг них. Это можно видеть из следующего примера.

Обычно ζ-потенциал и подвижность в электрическом поле вирулентных форм бактерий (так называемые S-формы бактерий, имеющие округлые колонии с гладкими краями) значительно ниже, чем у R-форм (колонии с шероховатыми краями). Например, у тифозной бактерии подвижность S-форм составляет 0,5—0,1 *мк/сек*, а у R-форм — 1 *мк/сек*. Несмотря на относительно небольшую подвижность суспензии S-формы значительно более стабильны, чем R-формы. Это объясняется тем, что поверхность клеток R-форм бактерий состоит из липоидов, обусловливающих гидрофобность частицы. Поэтому стабильность суспензии R-форм бактерий определяется, в основном, только за счет заряда поверхности клетки, т. е. электрокинетическим потенциалом, и агглютинация таких клеток линейно растет с падением ζ-потенциала. Поверхность S-форм бактерий содержит белки, определяющие гидрофильные свойства клеток. Поэтому стабильность суспензий S-форм осуществляется не только за счет величины заряда поверхности, но и сольватацией клетки.

Физико-химические свойства поверхности бактерий, обусловливающие устойчивость суспензий, определяют поведение клеток при добавлении в дисперсионную среду различных электролитов.

Так, при одной и той же концентрации одновалентные катионы могут вызвать агглютинацию у R-форм, в то время как S-формы не агглютинируют несмотря на снижение у них электрокинетического потенциала.

Агглютинация R-форм бактерий быстро наступает при добавлении многовалентных катионов (алюминий, лантан, торий), которые не только резко снижают величину ζ-потенциала, но и способны разрушать сольватные оболочки.

Величина электрокинетического потенциала клеток и частиц в значительной степени зависит от ионного состава среды. Если поверхность дисперсной фазы заряжена отрицательно, то добавление малых концентраций одновалентных катионов может вызвать увеличение отрицательного электрокинетического потенциала. Это происходит в связи с тем, что анионы приближаются к поверхности частицы. Увеличение концентрации одновалентных катионов в дисперсионной среде приводит к тому, что ионная атмосфера, окружающая поверхность частицы, по мере увеличения концентрации катионов в растворе сжимается и становится более плотной;

всё бóльшая часть катионов переходит из диффузионного слоя в адсорбционный. Все это приводит к падению величины ζ-потенциала.

Двух- и многовалентные катионы обладают значительно большей способностью уменьшать ζ-потенциал и вызывают даже перезарядку поверхности частицы.

Если в дисперсионную среду добавлять равные концентрации одновалентных анионов и катионов, то при невысоких концентрациях ионов в силу большой адсорбционной способности анионов, по сравнению с катионами, отрицательный заряд поверхности частицы будет возрастать. При больших концентрациях ионов основное влияние на величину потенциала оказывают катионы.

В связи с большой адсорбционной способностью водородные и гидроксильные ионы оказывают большое влияние на заряд на поверхности частиц.

На основании всего изложенного можно отметить, что величина электрокинетического потенциала при равных других условиях электрофореза зависит от физико-химической структуры поверхности клеток — от собственного заряда при диссоциации ионогенных групп, от ионов, адсорбированных на поверхности, от противоионов диффузионного и адсорбированного слоя, а также от концентрации и валентности ионов, добавленных к дисперсионной среде.

Биологические объекты, отличающиеся друг от друга электрохимическими свойствами клеточной поверхности, имеют различный по величине электрокинетический потенциал.

Таблица 14

Скорость и величина ζ-потенциала эритроцитов (в изотоническом растворе фосфатного буфера при pH 7,4) различных видов млекопитающих

Вид животного	Скорость, (в *мк/сек* при $E=1$ *в/см*)	Дзета-потенциал (в милливольтах)
Кролик	0,55	7,0
Свинья	0,98	12,5
Морская свинка	1,11	14,2
Человек	1,31	16,3
Обезьяна (мокак резус)	1,33	17,0
Кошка	1,39	17,8
Крыса	1,45	18,6
Собака	1,65	21,1

Так, эритроциты, имеющие стабильные величины ζ-потенциала для одного и того же вида[1] животных, обнаруживают значительные вариации потенциала для различных видов (табл. 14).

[1] Электрокинетический потенциал эритроцитов человека не обнаруживает различий между эритроцитами разных рас (белой, желтой, черной), разных полов, разных групп крови.

Величина электрокинетического потенциала таких клеток, как лейкоциты, бактерии и другие, не обнаруживает стабильности в пределах одного вида.

Так, у бактериальных клеток ζ-потенциал связан с их возрастом. У более молодых клеток наблюдается более высокий отрицательный потенциал. У разных видов и даже рас бактерий ζ-потенциал имеет различные значения — от очень высоких до близких к нулю.

Лейкоциты обычно имеют меньшую подвижность в электрическом поле, чем эритроциты (см. табл. 15).

Таблица 15

Скорость движения форменных элементов крови лошади

Форменные элементы	Скорость, в *мк/сек*
Эритроциты	1,01
Полиморфоядерные лейкоциты	0,51
Лимфоциты	0,60
Тромбоциты	0,51

Наиболее удобно измерять подвижность бактериальных клеточных суспензий, которые в силу небольших размеров долго остаются взвешенными на одном уровне в растворе. Измерение электрокинетического потенциала клеток, обладающих активным движением, например сперматозоидов, значительно усложняется.

Следует упомянуть о попытках изучить подвижность отдельных структурных образований (протопласта, ядра, вакуоли) внутри живых растительных клеток.

Электрофоретическая подвижность клеточных элементов производилась с помощью метода «внутриклеточного электрофореза», разработанного Д. Л. Рубинштейном и В. Д. Успенской.

Метод внутриклеточного электрофореза заключается в том, что изучаемая специально подготовленная ткань (чешуйки лука, прозрачная ткань листьев водных растений) неподвижно укрепляется в любой плоской камере для микроэлектрофореза и помещается в электрическом поле постоянного тока. Чаще всего изучалась подвижность протопласта в электрическом поле. Для этого растительная ткань предварительно подвергалась легкому плазмолизу так, чтобы поверхность протопластов округлилась и отделилась от окружающих целлюлозных стенок клеток. После замыкания тока протопласты приходят в движение внутри живой клетки, представляющей миниатюрную электрофоретическую камеру. Протопласты движутся в сторону анода, дойдя до целлюлозных клеточных стенок, они останавливаются, плотно примыкая к ним. При изменении направления тока протопласты передвигаются

в противоположную сторону — вновь к аноду (рис. 95). Абсолютные измерения величины электрокинетического потенциала и подвижности клеточных элементов с помощью метода внутриклеточного электрофореза осуществить трудно вследствие трения протопласта о целлюлозные стенки. Этим методом можно измерять относительные изменения величины ζ-потенциала у одной и той же клетки, а также знак заряда поверхности исследуемых объектов и влияние на их потенциал внешних воздействий. Так,

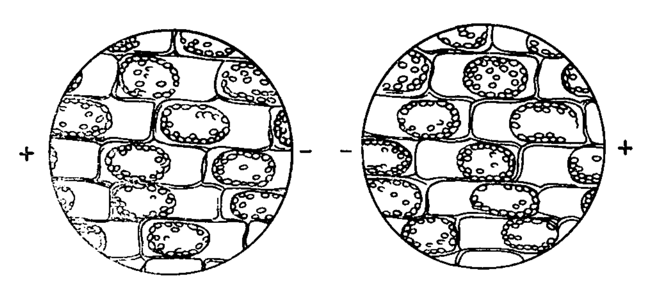


Рис. 95. Внутриклеточный электрофорез протопластов элодеи

с помощью метода внутриклеточного электрофореза было показано, что клетки элодеи и чешуек лука имеют стойкий отрицательный потенциал, величина которого не меняется в широком диапазоне изменения pH среды.

Изучение электрокинетического потенциала клеток различных тканей растений и животных представляет и практический интерес.

В последнее время электрокинетические явления, происходящие в тканях, используются в клинической медицине с целью введения лекарственных веществ через кожу — ее поры, волосяные луковицы, потовые и сальные железы.

Как известно, проницаемость кожи для различных веществ незначительна. Стенки пор кожи имеют электрический заряд, а сами поры обычно заполнены воздухом. При помещении участка кожи в электрическое поле постоянного тока может произойти электроосмотическое движение жидкости изнутри наружу. При этом воздух удаляется из пор, а последние заполняются жидкостью, причем проницаемость кожи для различных веществ заметно увеличивается. Это дает возможность вводить через кожу различные лечебные вещества, ранее не обладавшие возможностью проникать в организм через кожные покровы. Введение различных лекарственных веществ через кожу при наложении на нее потенциала показало, что проницаемость этих веществ, в том числе и высокомолекулярных, происходит в результате взаимодействия, по крайней мере, двух явлений — электрофореза самих частиц и противоположно направленного электроосмоса воды:

$$v_s = v - u, \qquad (9.8)$$

где v_s — суммарное движение (движение частицы),

v — скорость движения частицы за счет ее электрофоретической подвижности,

u — скорость электроосмотического переноса.

Интересно, что в порах, так же как и в микрокамере для электрофореза, движение жидкости за счет электроосмоса неравномерно: оно максимально в пристеночных слоях и направлено в противоположную сторону в центре. На расстоянии приблизительно одной

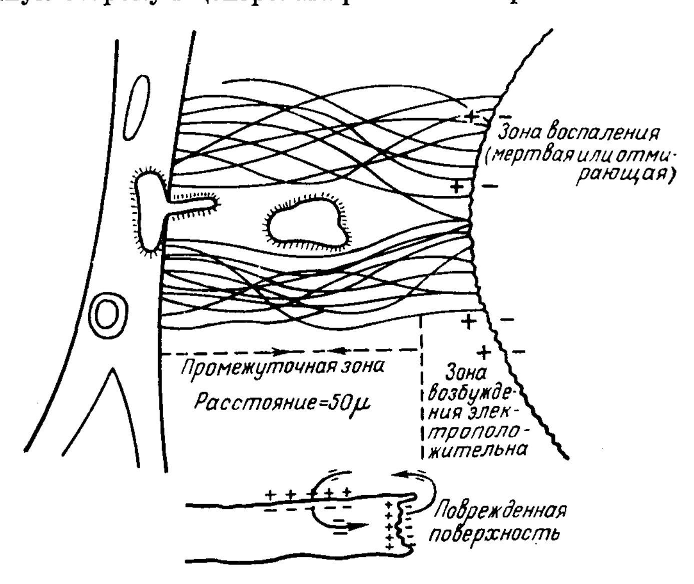


Рис. 96. Схема миграции лейкоцитов под влиянием внутренних электрических полей к воспаленному участку (по Абрамсону)

пятой от поверхности стенок скорость электроосмотического движения воды приближается к нулю (см. стр. 292). В связи с этим проницаемость веществ через кожу в одном направлении может осуществляться как со стороны анода, так и со стороны катода. Однако проницаемость некоторых веществ (например, ряд красителей), имеющих положительный потенциал (т. е. противоположный стенкам пор знак заряда), значительно затруднена в связи с адсорбцией этих веществ на стенках пор.

По мнению ряда авторов (H. Abramson, L. Moyer, M. Yorin), электрокинетические явления можно наблюдать при миграции лейкоцитов в воспалительные очаги. Известно, что в воспаленных участках происходят процессы разрушения клеточных структур (белков, углеводов, комплексов белков с другими соединениями и других веществ). При этом в воспалительном очаге происходит накопление количества свободных молекул, главным образом

органических кислот и ионов калия, что приводит к резкому сдвигу pH среды в воспаленном участке в сторону уменьшения pH до величин 6,2—6,5.

В результате этих физико-химических изменений воспалительная ткань приобретает положительный потенциал по отношению к неповрежденному, интактному участку. Возникает разность потенциалов, достигающая до 100—150 *мв*. По мнению упомянутых авторов, образующийся на границе между воспаленным и здоровым участком положительный потенциал (рис. 96) ответствен за процессы миграции лейкоцитов из капилляров к воспалительному очагу. На рис. 96 видно, что лейкоциты приближаются к стенкам капилляра, находящегося вблизи от воспаленного участка, а затем, по мере увеличения проницаемости капилляров, проникают через их стенку и движутся к воспаленному участку. Представление о роли электрофоретической подвижности лейкоцитов при воспалении не может, однако, полностью объяснить сложные процессы миграции лейкоцитов, в которых большую роль играет активное передвижение клеток к воспалительным очагам.

В настоящее время роль электрокинетических явлений, происходящих в сложных гетерогенных системах — клетках и тканях живых организмов (в норме и патологии),— изучена далеко еще недостаточно.

Безусловно, что физико-химические свойства поверхности биосубстратов обусловливают образование той или иной величины электрокинетического потенциала, который возникает в результате движения фаз гетерогенных систем. Поэтому задачей биофизических экспериментов и в данном вопросе является изучение молекулярных физико-химических явлений и превращений, лежащих в основе первичных механизмов биологических процессов.

ГЛАВА X

МЫШЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ

Одной из основных биологических функций протоплазмы является ее способность сокращаться, и за счет этого сокращения производить работу. Поэтому вопрос о механизмах мышечного сокращения привлекал большое внимание биофизиков, которых интересовали источники энергии, необходимой для осуществления сократительных функций, молекулярное строение и механические свойства сократительных элементов. Основным вопросом, интересующим биофизика, является природа механизма перехода химической энергии в механическую.

Уже в тридцатых годах нашего столетия были проведены достаточно точные работы, выявившие величины энергетических затрат, которые производятся мышцами при сокращении. Гиллу с помощью высокочувствительной термоэлектрической батареи удалось определить количество тепла, выделяемого мышцей лягушки при изометрическом сокращении. На этом основании биохимиками делались попытки создать количественную схему энергетического обеспечения сокращения. Они исходили из положения, что источником, непосредственно поставляющим энергию для мышечного сокращения, является распад гликогена до молочной кислоты.

В ряде физико-биологических исследований были изучены упруговязкие свойства мышц при различных состояниях. Значительным шагом вперед в проблеме мышечного сокращения было открытие и изучение свойств мышечных белков, которые являются по своей природе полимерами и при полимеризации образуют фибриллы, т. е. являются типичными фибриллярными белками.

Феномены ионного обмена, которые наблюдаются при мышечном сокращении (выход калия, переход кальция из связанного состояния в ионизированное, изменения pH), показали, что ионным процессам принадлежит крупная роль в акте мышечного сокращения, о чем также говорят те электрические явления, которые сопровождают мышечную активность.

Однако остается все же неясным вопрос, в силу каких молекулярных перегруппировок осуществляется самый акт сокращений.

Для понимания механизмов мышечного сокращения большое значение имеют механо-химические представления. В последнее десятилетие в физической химии полимеров было установлено, что некоторые химические взаимодействия вызывают сокращение нитей полимеров и при этом производится механическая работа, энергия для которой поставляется химической реакцией и, наоборот, приложение механической силы к растяжению полимерных нитей индуцирует возникновение химических превращений в обратном направлении.

Для понимания механизмов перехода химической энергии в механическую весьма показательны модели из полимеров, сшитых в трехмерную сетку. Интерес представляют собой волокна, получающиеся из полиакриловой кислоты (ПАК) и поливинилового спирта (ПВС). Поведение этих систем позволяет выявить те свойства, которые лежат в основе механо-химических явлений в полимерах, и на этой основе разобраться в тех существенных надстройках, которые возникли в сократительных биологических аппаратах. Волокна, построенные из этих полимеров, изменяют свою длину при действии различных химических агентов и при этом могут производить работу.

Основная особенность таких полимерных систем состоит в том, что они наиболее резко и наиболее полно реагируют на изменение внешней химической среды, в которой они могут находиться. Из всех систем, которые могут растворяться в воде, полимерная (вернее, полиэлектролитная) система наиболее чувствительна к изменениям кислотно-основного равновесия (т. е. рН среды) и окислительно-восстановительного равновесия, например вытянутая цепочка полиакриловой кислоты. При подкислении раствора такая полимерная цепочка будет стремиться свернуться в клубок. Следовательно, вся такая ниточка будет сокращаться. Наоборот, если такую ниточку погрузить в щелочной раствор, то при образовании соли в макромолекуле возникают заряды и, следовательно, полимерная цепочка будет стремиться вытянуться. Если подвесить к ней груз, то можно получить машину, совершающую механическую работу, т. е. поднимающую или опускающую груз за счет химической энергии, получаемой при диссоциации.

На примере другой полимерной системы — поливинилаллоксана (ПВА) было показано, что процессы сокращения — расслабления можно осуществить, не прибегая к изменениям рН среды. ПВА — слабая кислота с константой диссоциации 10^{-7}. Она легко восстанавливается, превращаясь в поливинилдиалуровую кислоту (ПВДК) по схеме (см. стр. 302).

ПВДК — уже сильная кислота с константой диссоциации 10^{-3}. Процесс такого «превращения» идет легко и обратимо. При рН, равном 5, ПВА будет не диссоциирована, а ПВДК, являясь более

$$[CH_2 - \underset{\underset{\underset{\underset{\underset{NH}{|}}{CO}}{|}}{\underset{|}{NH}}}{CH}]_n \;\rightleftharpoons\; [-CH_2 - \underset{\underset{\underset{\underset{\underset{NH}{|}}{CO}}{|}}{\underset{|}{NH}}}{CH}-]_n$$

$$\underbrace{\begin{array}{cc} CO & - NH \\ | & | \\ (CO) & CO \\ | & | \\ CO & NH \end{array}}_{\text{ПВА}} \qquad \underbrace{\begin{array}{cc} CO & - NH \\ | & | \\ (CHOH) & CO \\ | & | \\ CO & NH \end{array}}_{\text{ПВДК}}$$

сильной кислотой, при этом значении pH полностью диссоциирована. Если цепочку из ПВДК окислять в ПВА, то она будет свертываться в глобулу, а при восстановлении ПВА цепочка будет выпрямляться. При восстановлении ПВА до ПВДК макромолекулярная цепочка будет стремиться выпрямляться.

В этом случае система может совершать механическую работу за счет окислительно-восстановительного процесса. Это возможно только при переменном пропускании водорода и кислорода, которое приводит либо к выпрямлению, либо сокращению такой полимерной цепочки.

Очень интересные данные были получены на макромолекулярных системах, представляющих собой сополимеры, сшитые в трехмерные сетки. При различных химических воздействиях на такие сополимерные системы (ПАК + ПВС) наблюдалось изменение конфигурации этих макромолекул и при этом происходило растяжение и сокращение этих систем, и при наличии обратимости эти полимерные системы могли производить механическую работу.

Все модели мышцы могут быть систематизированы по следующим признакам:

1) pH-модели, у которых химическим фактором, вызывающим сокращение и расслабление, является изменение pH;

2) редокс-модели, у которых фактором сокращения является изменение окислительно-восстановительного потенциала, т. е. энергия окисления и восстановления непосредственно превращается в работу;

3) кальциевые модели, в которых фактором, вызывающим сокращение, являются свободные ионы кальция, а расслабление вызывается их удалением.

Наиболее известной pH-моделью является сополимер полиакриловой кислоты $[-CH_2 - \underset{\underset{COOH}{|}}{CH} -]_n$ с поливиниловым спиртом $[-CH_2 - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} -]_n$.

Этот сополимер дает волокна, обладающие большой прочностью.

При прибавлении кислоты он дает сокращение, при прибавлении щелочи — расслабление. Сокращение составляет примерно 50%. Раньше объясняли это сокращение снятием электростатических зарядов. В настоящее время некоторые считают, что это вызывается изменением условий доннановского равновесия. Эта модель представляла интерес в связи с тем, что высказывались предположения, что измерения pH играют роль при мышечном сокращении. В настоящее время делаются попытки выяснить изменения pH в мышечных волокнах во время сокращения. Опыты последних лет с использованием современных методов показывают, что такие изменения в мышечных фибриллах лягушки происходят, но величина изменений невелика, не более 0,1 pH. Этого слишком мало для того, чтобы вызвать сокращение макромолекул, но может быть достаточно для того, чтобы вызвать освобождение, например, кальция из связанного в свободное состояние. Однако несмотря на это, модельная система показывает возможность осуществления работы за счет изменения электростатических сил на поверхности макромолекул.

Наибольший интерес привлекают модели, в которых можно было получить сокращение при прибавлении кальция и других двухвалентных катионов. Та же система, которая сокращается при изменении pH, может давать механическое сокращение при прибавлении кальция. Для этой цели в модельных опытах применялся детергент — этилендиамин тетрауксусной кислоты — комплексная соль, связывающая ионы кальция. Так как этот агент специфичен для кальция, то в его присутствии сокращение может быть вызвано ионами магния. В этих условиях может проявиться как бы «антагонизм» между ионами кальция и магния. Эта модель поучительна, так как кальцию давно уже приписывалась важная роль в мышечном сокращении.

Хорошо известны биологические опыты на живой мышце, где удавалось снять сокращение при прибавлении детергентов. В настоящее время вряд ли можно сомневаться в том, что акт сокращения в самых различных модификациях является обратимым изменением структуры биополимеров. Поэтому наиболее актуальной задачей является получение конкретной информации о состоянии биополимеров в мышцах в состоянии покоя и сокращения.

С полимерной точки зрения акт сокращения возникает при конформационных превращениях структур. Для образующих полимерные нити веществ известны две конфигурации: α-конфигурация, когда нити линейно вытянуты, и β-конфигурация, когда эти нити собраны в клубок. Переход из конфигурации α в конфигурацию β и является сократительным актом. Это изменение конфигурации зависит от перераспределения и возникновения электростатических сил Ван-дер-Ваальса на поверхности

макромолекул. Эти силы и их топография связаны в полиэлектролитных молекулах с ионами. Поэтому их конфигурация определяется распределением ионных сил и теми химическими процессами, которые вызывают акт сокращения.

Сильное влияние на интерпретацию мышечного сокращения оказали данные о структуре коллагена, полученные в последние годы. Проведенные различными оптическими методами исследования показывают, что в коллагене очень часто наблюдаются спиралевидные структуры. Эти спиралевидные образования могут быть однонитными или построенными из двух или трех нитей. Некоторые исследователи придерживаются точки зрения, что мышечное сокращение обусловлено сокращением этих нитей. При этих построениях принимается, что нити являются по своим свойствам макромолекулами полиэлектролитов и изменение длины спирали наступает при изменении электростатических сил на поверхности этих макромолекул — кулоновских сил притяжения и отталкивания. Величина этих сил зависит от диэлектрической проницаемости среды. Можно не без оснований предполагать, что диэлектрическая проницаемость в клетках и фибриллах значительно меняется при изменении активности ионов в водной фазе и что это может вызывать изменение длины спиралей.

Предположение о том, что сокращение мышечных фибрилл, вероятнее всего, зависит от изменения конфигурации макромолекул фибриллярных белков и возможно даже от перехода их из состояния глобулярного в фибриллярное, имеет много оснований. Сокращение мышц сопровождается рядом физико-химических изменений, которые говорят о том, что ионные процессы играют при этом важную роль. Именно в свойствах полиэлектролитов следует искать разгадки молекулярных явлений, с которыми связаны изменения длины макромолекул.

БИОПОЛИМЕРЫ МЫШЦЫ

Большие успехи были достигнуты в отношении познания природы и свойств белков, специфичных для сократительных биологических систем. В настоящее время установлено, что это — крупные полимерные молекулы, относящиеся к группе полиэлектролитов, которые способны изменять свою длину при механо-химических воздействиях.

Характерной особенностью мышечных фибриллярных белков является периодичность их структур и наличие поперечной оптической исчерченности, которая, как известно, является характерной особенностью поперечнополосатых мышц.

Другой характерной особенностью этих белков является то, что они не связаны с нуклеиновыми кислотами, т. е. не образуют нуклеопротеидов.

Важнейшими из этих белков является актин, типичный фибриллярный белок, экстрагируемый глицерином из поперечнополосатых и гладких мышц как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Молекулярный вес этого белка варьирует в пределах 50 000—80 000. Длина его молекул более 10^3 Å. По своим свойствам это полимер. Изучение его рентгеноструктурным анализом показало, что этот белок характеризуется периодичностью в 400 Å.

Второй белок — миозин был открыт очень давно. Его молекулярный вес 42 000, он составляет до 60% белка в скелетных мышцах. Это глобулин, имеющий периодичность 1600 Å. При расщеплении миозина протеолитическими ферментами он распадается на два фибриллярных белка — тяжелый и легкий меромиозин, обладающий сходными с миозином свойствами. Из гладких мышц беспозвоночных был выделен миозин другого типа, у которого предельный период равен 725 Å. Этот белок характерен, например, для запирательных мышц моллюсков.

Сент-Дьердьи (A. Szent-Dyörgyi) открыл, что сократительным элементом мышечных фибрилл поперечнополосатых мышц является комплекс актина и миозина — актомиозин. В то же время следует учесть, что миозин, полученный из гладких мышц беспозвоночных (парамиозин), не соединяется с актином и не дает актомиозинового комплекса.

Крупным открытием, значительно прояснившим проблему мышечного сокращения, было наблюдение В. А. Энгельгардта и М. Н. Любимовой, установивших, что миозин обладает ферментативной активностью и способен расщеплять вещества, которые дают энергию для расслабления. В опытах с нитями миозина удалось in vitro наблюдать сокращение их при ферментативном расщеплении АТФ. Дальнейшие исследования показали, что аденозинтрифосфатазной активностью обладает тяжелый меромиозин.

Исследования поведения мышечных белков в растворах электролитов показали, что агрегатное состояние этих белков может сильно меняться при незначительном изменении ионной силы раствора. Например, при повышении концентрации электролитов на несколько десятых моля миозин Б, который очень близок по своим свойствам к актину, переходит из осадка в раствор. В этом состоянии его макромолекулы являются анионами. При добавлении АТФ вязкость этого миозина уменьшается. Когда же он приобретает свойства катиона (в результате прибавления двухвалентных ионов), прибавление АТФ понижает его растворимость; при этом происходит структурообразование и выжимание воды из геля.

Все эти явления, наблюдающиеся при сокращении мышц, указывают на то, что при сокращении, так же как и при возбуждении, происходят изменения, характерные именно для электролитов.

ЭНЕРГЕТИКА СОКРАЩЕНИЯ

Основным источником энергии мышечного сокращения является гликоген. При мышечном сокращении он освобождает значительное количество энергии, распадаясь до молочной кислоты, которая в присутствии кислорода во время покоя (расслабления мышцы) снова ресинтезируется в гликоген реакциями цикла Кребса. Однако дальнейшие исследования показали, что реакция гликолиза не дает прямо энергию для мышечного сокращения. Непосредственные опыты с отравлением мышцы монойодуксусной кислотой показали, что хотя последняя и не подавляет полностью способность к мышечному сокращению, но сильно уменьшает ее производительность, т. е. приводит к утомлению. Поэтому можно предполагать, что имеется промежуточный резервуар энергии, непосредственно поставляющий энергию для мышечного сокращения, который получает эту энергию за счет гликолитического источника. Крупным шагом вперед было открытие макроэргических соединений. Было установлено, что непосредственно энергия для мышечного сокращения поставляется за счет гидролитического распада аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), которая, как оказалось, связана с миозином. Общее количество энергии, содержащейся в этом резервуаре, в 30—40 раз меньше той энергии, которая содержится в мышечном гликогене. Особенностью АТФ является то, что при гидролитическом отщеплении фосфорной кислоты выделяется около 8000 калорий на моль. При распаде АТФ образуется АДФ (аденозиндифосфорная кислота), которая снова ресинтезируется за счет энергии гликолиза.

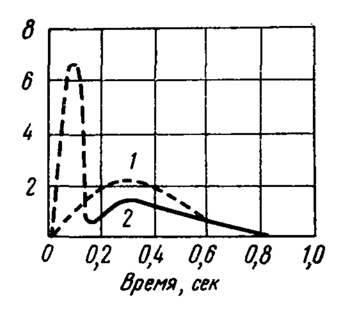


Рис. 97. Начальное теплообразование и развитие напряжения при изометрическом одиночном сокращении портняжной мышцы лягушки при 0° С (по Хиллу): *1* — напряжение; *2* — теплообразование. Форма начальной части кривой теплообразования в точности не установлена. Напряжение показано в относит. ед.

Для понимания общей схемы процесса мышечного сокращения играют определенную роль вышеописанные биофизические исследования теплообразования в мышцах. Эти исследования показали, во-первых, что в момент сокращения выделяется только очень незначительная часть тепла, по сравнению с выделением его после сокращения (рис. 97). Это доказывает, что мышца находится в состоянии готовности к сокращению и для восстановления этого исходного состояния требуется энергия, бо́льшая, чем энергия, необходимая для самого акта сокращения. Во-вторых, эти опыты показывали, что имеется какой-то механизм авторегулирования, благодаря которому количество затраченной энергии («заряда»)

не может превысить норму, необходимую для единичного сокращения.

Многими исследователями было показано, что прибавление АТФ к мышечным фибриллам вызывает сокращение. Прибавление АТФ вызывает сокращение актомиозинового комплекса. Подсчеты показывают, что вся имеющаяся в мышце АТФ связана с высокополимерами, осуществляющими сократительный акт, и с их магниевыми группами.

Актин обладает двойным лучепреломлением только тогда, когда он связан с кальцием, и только в присутствии иона кальция он образует фибриллы. Поэтому есть основания считать, что при акте сокращения происходит переход глобулярной формы актина в фибриллярную и что это превращение осуществляется при появлении в окружающей среде свободных ионов кальция. По-видимому, именно в этом состоянии актин взаимодействует с миозином. Структурная вязкость возникает, как было установлено, только при возникновении актомиозинового комплекса. Роль иона кальция при этом бесспорна, и следует учесть, что исследования Гейльбрунна выявили, что вообще изменения вязкости и структурообразования в клетках (в протоплазме) всегда связаны с появлением свободного кальция.

Основной проблемой сегодняшнего дня является выяснение молекулярного механизма, при помощи которого АТФ в мышечных фибриллах, находящаяся в неактивном состоянии, переходит в активное состояние. Существует точка зрения, что в мышце имеется ингибитор АТФ, который препятствует его распаду. Действительно, из покоящейся мышцы был экстрагирован фактор, химическая природа которого еще неясна, названный фактором Марш-Бендера. В присутствии этого фактора не происходит сокращения актомиозинового комплекса. Это ингибирование снимается, если к такой системе, содержащей неактивный АТФ, прибавляются ионы кальция.

Второй важный вопрос — это вопрос о том, каким образом энергия, освобождающаяся при распаде АТФ-комплекса, приводит к молекулярной перегруппировке, при которой происходит сокращение длины фибрилл. В настоящее время довольно широко распространена точка зрения, что при непосредственном акте сокращения фибриллы укорачиваются потому, что происходит скольжение полимерных нитей актина по отношению к нитям миозина. Это связано с изменением сил межмолекулярного сродства. Нити сократительных белков, согласно этой гипотезе, частично накладываются друг на друга и соединяются в ряде точек слабыми химическими связями. При распаде АТФ происходит усиление взаимодействия и одна нить наползает на другую. При этом каждая отдельно взятая нить не меняет своей длины. Были сделаны попытки дать химическую интерпретацию подобного скольжения. Согласно схеме Вебера (рис. 98), при распаде АТФ

происходит фосфорилирование актина. При последующем отщеплении фосфата возникает кислородная связь между актином и миозином. Эта связь перемещается, согласно схеме, через участок, содержащий сульфгидрильную группу (фермент), и здесь подвергается гидролизу. После этого процесс повторяется в новом звене и т. д.

В этой схеме многое вызывает сомнения. Во-первых, неясно, почему происходит скольжение в одну сторону, так как химический процесс равновероятен в двух направлениях. Во-вторых,

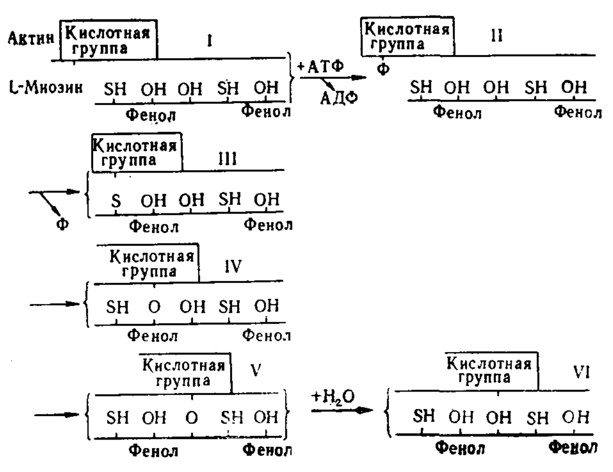


Рис. 98. Схема мышечного сокращения, предложенная Вебером.
Объяснение см. в тексте

совершенно пока не обосновано предположение о фосфорилировании актина при распаде АТФ. Попытки получить фосфорилирование актина оказались безуспешными. Основной материал, которым оперируют авторы изложенной гипотезы, — это электронно-микроскопическое исследование покоящейся и сокращенной мышцы. При этих наблюдениях, несмотря даже на возможность получения высоких увеличений, нельзя, конечно, рассмотреть и дифференцировать, имеются ли в фибриллах две нити, наползающие друг на друга. Критерием является только утолщение на некоторых участках фибрилл. Это утолщение и интерпретируется некоторыми авторами как эффект, обусловленный наползанием миозина на актин. Но этот же эффект может объясняться и другими механизмами. В то же время против этой гипотезы имеются простые возражения. Так, например, известно, что одиночное волокно мышц животных можно растянуть больше чем в два раза и, если его раздражать, то оно развивает вполне нормальное тянущее усилие. Если же принять схему взаимодействия нитей, то уже при полуторном растяжении они должны потерять контакт друг с другом.

Остается пока неясным, каким образом происходит активация реакции распада АТФ. В этой активации при мышечном сокращении определенную роль играет кальций. При изучении влияния солей на движение протоплазмы было установлено, что катионы — калий, натрий и магний — ускоряют движение протоплазмы. В то же время кальций замедляет движение и вызывает структурирование протоплазмы, приводящее к полной остановке ее движения. Интересно, что этот эффект может быть получен и с помощью других ионов — лития и бария. Однако при этом, обычно, явление оказывается необратимым и клетки погибают. Уже давно отмечалось, что для мышечного сокращения необходимейшим условием является присутствие во внешнем растворе ионов кальция. Многие авторы утверждали, что в то время, как натрий и калий необходимы для создания условий существования клеток, кальций нужен именно для сократительной деятельности. Было установлено, например, что скорость сокращения сердца лягушки зависит и функционально связана с концентрацией ионов кальция в растворе, пропускаемом через сердце. Было отмечено, что при усиленной мышечной работе у кроликов и собак повышается содержание кальция в мышцах за счет мобилизации его из костей. Это хорошо иллюстрируется опытами Гейльбрунна, который вводил микропипеткой различные солевые растворы в мышечное волокно. Было показано, что при введении солей натрия и калия получается только очень слабый эффект. При введении же в фибриллу даже очень слабых растворов хлористого кальция (0,0002 М) можно было наблюдать очень резкое сокращение. Эффект этот не зависел от изменений pH раствора.

Все это подтверждается хорошо известным фактом свертывания белков плазмы крови, являющейся ферментативным процессом, который осуществляется только в присутствии кальция. Возрастание концентрации кальция активирует этот процесс. Интересно, что некоторым авторам удавалось обнаруживать в мышцах присутствие тромбопластина и протромбина, а также и то, что при раздражении мышц в них образуется тромбин. Вещества этого типа были обнаружены не только в мышечной ткани высших животных, но и у беспозвоночных. Можно говорить о том, что процессы свертывания крови имеют много общего с мышечным сокращением.

Что же является запальным механизмом? В результате какого действия происходит освобождение ионов кальция, если считать, что это именно те ионы, которые могут подавить ингибирование АТФ? Можно предполагать, что такой первичной реакцией могут быть, например, тиксотропные явления. Тиксотропия — это свойство гелей при механическом воздействии переходить в золь. Было показано, что белки, выделенные из мышц, при геле-

образовании обнаруживали четкий тиксотропный эффект. Обычно в системах, образующих тиксотропные гели, наблюдаются в состоянии золя явления реопексии. При механических и электрических воздействиях в этих золях ускоряется гелеобразование. Этот механо-химический эффект может привести к распаду электростатических и ионных связей и освобождению кальция, который активирует первичный распад АТФ. Далее эта реакция должна автокаталитически распространяться, и весьма возможно, что ее распространение определяется структурированием.

Одним из важнейших вопросов представляется вопрос о том, существует ли в фибриллах мышц сократительные белки в форме полимеризованных нитей или они образуются в акте сокращения. Ряд наблюдений над мышцами и фибриллами говорит о том, что в состоянии покоя внутренность мышечных фибрилл представляет собой среду с очень низкой вязкостью. Было показано, например, что если ввести с помощью микропипетки воду в мышечное волокно, то она быстро смешается с внутренней средой; следовательно, внутренняя среда может быть жидкостью.

Прямых измерений вязкости внутримышечного волокна проводилось мало. Ризер (P. Rieser) вводил микропипеткой капли масла внутрь мышечных волокон лягушки, измеряя скорость их поднятия вверх. Отсюда была вычислена вязкость внутримышечного волокна. Максимальное количество измерений дало величину вязкости, равную 29 сантипаузам. Так как при повреждении вязкость всегда увеличивается, считают, что более высокие значения, полученные в немногих опытах, были обусловлены повреждением.

Имеется много, к сожалению, неколичественных наблюдений на прозрачных мышечных волокнах беспозвоночных — кальмаров и червей. В этих наблюдениях отмечали, что в расслабленном состоянии мышцы прозрачны, а при прохождении волны сокращения они мутнеют. Вопрос о том, каковы связи в фибриллах при сокращении и предсуществуют ли они в мышечных волокнах, окончательно не решен, для решения этого вопроса необходимо получить информацию от живых объектов. В этом случае непригодна та информация, которая получается из наблюдений фиксированных препаратов под электронным микроскопом, так как там исследуются волокна в заведомо поврежденном состоянии, при котором, как это было установлено многочисленными исследованиями Гейльбрунна и других авторов, на живых объектах происходит структурообразование и резкое повышение вязкости. К этому необходимо добавить, что хотя пока непосредственных наблюдений над вязкостными свойствами и структурообразованием мало, тем не менее нужно учесть, что структурообразование при возбуждении, сопровождающееся резким повышением вязкости, обнаружено на многих биологических объектах. Эта реакция связана с распадом АТФ и говорит о том, что в основе сокращения, возбуждения и нервного проведения лежит один основной механизм.

Все вышеотмеченные данные, в основном, получены при изучении поперечнополосатых мышц. У гладких мышц имеется ряд отклонений, например они не обладают электрической деполяризацией при сокращении. Однако все же ясно на основании имеющихся данных, что основные механо-химические принципы на различных уровнях сократительных механизмов остаются теми же, которые известны и для поперечнополосатых мышц. Эти основные принципы уже явно ощущаются на феномене движения протоплазмы.

В последнее время накоплен большой материал, который показывает, что система АТФ присутствует в протоплазме всех клеток и с присутствием АТФ связаны изменения (переходы) агрегатного состояния протоплазмы.

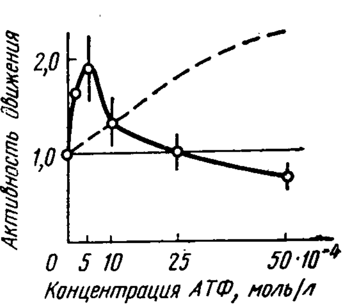


Рис. 99. Зависимость между концентрацией АТФ во внешней среде и подвижностью маленьких кусочков плазмодия *Physarum polycephalum* (по Курода). За единицу активности принята активность движения в среде, не содержащей АТФ. Вертикальные отрезки показывают величины средних ошибок. Пунктирная кривая — изменение вязкости (в условн. ед.)

О движении протоплазмы, которое наблюдается в растительных клетках, имеется много исследований. Протоплазма в крупных растительных клетках, когда эти клетки находятся в состоянии покоя, двигается, и ее гранулы совершают линейное поступательное движение. Иногда к нему добавляется ротационное и колебательные движения. Скорость этого движения в масштабах клетки велика и достигает 1000 микрон в секунду. Это движение явно связано с интенсивностью метаболизма и содержанием кислорода, однако физико-химические механизмы этого движения еще не расшифрованы. При изменении физиологического состояния клетки, например при переходе из состояния покоя в состояние возбуждения, это движение приостанавливается вследствие того, что вязкость протоплазмы повышается. Часто она при этом переходит в состояние геля, т. е. твердое состояние с точки зрения гидродинамики.

Явление затвердевания протоплазмы и остановки ее движения явно связано с системой АТФ. Было показано, например, экспериментально на водорослях и миксомицетах, что при прибавлении АТФ движение протоплазмы приостанавливается (рис. 99). Было установлено, что движение протоплазмы определяется двумя факторами — движущей силой и вязкостью протоплазмы. Эти два фактора можно дифференцировать и измерять раздельно. Было выяснено, что при действии АТФ движущая сила, как правило,

возрастает, поэтому в первый момент скорость движения увеличивается; но одновременно начинает возрастать вязкость — до полного затвердевания, и поэтому движение приостанавливается. Движение протоплазмы приостанавливается также от действия всех факторов, которые вызывают в клетках раздражение. Довольно детально изучена связь между биоэлектрическими потенциалами действия и приостановкой движения протоплазмы — ее структурированием — при прохождении электрической волны вдоль клетки. Предположение, что именно электрическая волна вызывает это гелеобразование, явно необосновано. Электрическая волна, которая пробегает вдоль клетки так же, как электрическая волна по нервному волокну, проходит без затухания амплитуды спайка несмотря на то, что омическое сопротивление клеток водоросли очень велико — порядка 10^9 *ом*. Скорее всего, сама электрическая волна является отражением волны химических превращений, пробегающих по протоплазме водоросли, при которых и происходит распад АТФ.

Некоторые исследователи делали попытки определить, что наступает раньше — волна электрических изменений или структурирование протоплазмы? Оказалось, что электрическая волна несколько опережает структурирование. Однако этот результат нельзя трактовать в том смысле, что волна опережает химическую реакцию. Остановка движения протоплазмы констатировалась только тогда, когда образовывался гель, но реакция явно начинается раньше. Полному структурированию должен предшествовать распад АТФ. В пользу именно такого предположения говорит наблюдение Л. Н. Воробьева, сделанное на водоросли *Nitella*. Если одновременно измерять волну потенциала и остановку протоплазмы при различных интенсивностях раздражения, то при подпороговых раздражениях (от источника, дающего напряжение не выше 1 *в*) остановки движения протоплазмы не происходит. При этом не возникает и электрическая волна потенциала действия. Однако при подпороговых раздражениях в месте приложения раздражения возникает типичный спайк, но он быстро затухает, так же как должен затухать сигнал в проводнике с высоким омическим сопротивлением. И только при повышении потенциала раздражения выше 1 *в* происходит остановка протоплазматического движения, и возникает распространяющаяся волна потенциала действия, которая проходит без затухания.

Описанный опыт говорит о том, что в том случае, когда интенсивность раздражения недостаточна для того, чтобы индуцировать распад АТФ так, чтобы начала развиваться автокаталитическая реакция, распространяющаяся по протоплазме, то электрическая волна затухает. Когда же интенсивность раздражения оказывается достаточной для индуцирования химической волны, то происходит и распространение электрической волны. Таким образом, можно считать, что она является результатом реакции. Следова-

тельно, остановка протоплазмы связана с энергетическим процессом.

В некоторых работах, в которых наблюдались изменения мутности и светопропускания мышц лягушки при различных воздействиях, было показано, что альтерация вызывает помутнение мышечных волокон, понижение их прозрачности. Сопоставление прозрачности и сократительной реакции мышц показывает, что контрактура начинается в момент ясно выраженного помутнения, т. е. тогда, когда происходит структурообразование, превращение золя в гель. Быстрые переходы из золя в гель заставляют предполагать, что в состоянии золя, при низкой вязкости, слабые взаимодействия создают уже некоторую зародышевую ориентировку подобно той, которая, как известно, часто наблюдается в ассоциатах высокополимерных молекул (так называемых роях). Подобные ассоциаты обнаруживают способность к реопексии, которая может играть роль первичного запального механизма для образования студня. Механо-химические процессы могут вызывать разрывы слабых ионных связей и при этом может происходить освобождение ионов кальция.

В настоящее время уже имеется ряд попыток объяснить механохимические явления, происходящие в живых системах. Наиболее реальные модели исходят из теории полиэлектролитного строения протоплазмы и специализированных сократительных белков. Акт сокращения (или образование студня) объясняется тем, что при освобождении энергии при распаде аденозинтрифосфата изменяется энергия ионизации ионогенных групп, расположенных вдоль макромолекул полиионов, и изменяются величины межионных сил. Эти изменения активности ионогенных групп осуществляются в результате так называемых кооперативных реакций. Константы скоростей этих реакций зависят от геометрического положения ионогенных групп по отношению друг к другу. Изменение положения групп должно сдвигать равновесие химической реакции. Именно этими кооперативными реакциями пытаются в настоящее время объяснить как эффект сокращения, так и переходы спираль — клубок у макромолекул актомиозина. Непосредственным фактором, который вызывает сокращение и продуцируется химической реакцией, является изменение pH или ионной силы среды. Согласно теоретическим расчетам, когда реакция является кооперативной, переход из состояния спирали в клубок и наоборот осуществляется очень быстро по закону все или ничего. Для понимания механизма сокращения фибриллярных белков большое значение имеет изучение их молекулярной структуры. Исследования по инфракрасной спектроскопии и рентгеноструктурного анализа и эластических свойств позволяет сделать некоторые выводы в отношении акта сокращения, происходящего в живых системах. Было показано, что в противоположность другим нестойким структурным компонентам клетки, например,

липопротеиновому комплексу, белки мышц являются значительно более стабильными. Например, известно, что мышцы, в отличие от печени, автолизируются гораздо медленнее. В то время как в печени, селезенке и других органах происходит сразу же после гибели биообъектов быстрый автолиз, мышцы автолизируются медленно и протеолитические реакции заметно развиваются только через несколько часов после смерти организма. Это позволяет предполагать, что сократительные белки, извлеченные из мышц, и их свойства, которые очень хорошо коррелируют с поведением сократительных элементов в живых мышцах, подвергаются меньшим изменениям, чем другие клеточные элементы.

По современным данным, опирающимся в основном на оптические измерения, характерной конфигурацией для полипептидных цепей большинства сократительных белков является α-форма. Наиболее характерно, что по рентгенографическим данным эта конфигурация выражена в актине и актомиозине.

Более редко наблюдается β-форма, когда полипептидные цепи вытянуты. Высказывалось предположение, что акт сокращения связан с тем, что конфигурация β переходит в конфигурацию α. Против этого предположения говорят некоторые исследования (Хаксли), в которых было показано, что α-конфигурация на растянутой мышце выражена лучше, нежели на сокращенной. Однако это еще нельзя считать достоверным, так как суждение об этом сделано на вытянутой мышце, которая была убита. Наряду с этим имеются данные, что переход из α- в β-форму вполне возможен. Такие данные были получены при нагревании переживающих мышц. При этом на рентгенограммах появлялся новый рефлекс, говорящий о наличии β-конфигурации. Однако этот рефлекс не появлялся при растяжении мышц.

Переход из состояния клубка в вытянутое состояние может происходить при изменении физико-химических свойств среды, а это изменение может происходить только за счет отщепления ионов и молекул от органических анионов полиэлектролитов. Изменение силы кулоновского взаимодействия зарядов, в первую очередь, может происходить за счет изменения диэлектрической проницаемости в результате изменения концентрации ионов солей. Как было показано, функция изменения диэлектрической проницаемости от концентрации солей является довольно сложной. Было, например, показано, что при возрастании концентрации солей диэлектрическая проницаемость сначала падает, а дальше повышается. Эта сложная зависимость определяется тем, что здесь идет конкуренция нескольких процессов. При некоторых концентрациях эффект гидратации превышает эффект, обусловленный увеличением свободных зарядов ионов.

ГЛАВА XI

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОТОСИНТЕЗА И ДРУГИХ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Предметом исследования этого раздела биофизики служит молекулярный механизм фотобиологических процессов, т. е. процессов, происходящих в биологических системах при поглощении квантов излучения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра.[1] В основе таких процессов лежит фотохимическая реакция, а фотобиологический процесс в целом представляет собой сложную цепь реакций, начинающихся с момента поглощения кванта и заканчивающихся самыми разнообразными биохимическими, физиологическими и общебиологическими эффектами.

Существует целая группа фотобиологических процессов, смысл которых заключается в синтезе биологически важных соединений за счет поглощаемой организмом солнечной энергии. К таким процессам относится фотосинтез зеленых растений, бактерий и водорослей.

Фотосинтез является единственным биологическим процессом, в котором происходит увеличение свободной энергии системы (около 120 *ккал/моль*); все остальные процессы осуществляются за счет потенциальной энергии, накапливаемой в фотосинтезирующих организмах при поглощении квантов излучения.

Другим примером синтетического процесса может служить биосинтез основного фотосинтетического пигмента — хлорофилла — из его предшественника (протохлорофиллида), протекающий почти моментально в первые секунды освещения этиолированных проростков растений.

Оба эти процесса протекают в высокоспециализированных структурах (хлоропластах), благодаря существованию сложного молекулярного аппарата, выработанного в ходе длительного эволюционного развития, и могут рассматриваться как полезные приспособительные процессы, составляющие основу жизнедеятельности растений. Значительно менее изучены синтезы, которые осуществляются в более простых системах и не нуждаются в специализированной биологической структуре. К такого рода явлениям относится образование органических соединений, например органических

---

[1] Автор выражает признательность А. А. Красновскому и Ю. А. Владимирову за помощь в работе над этим разделом книги.

кислот, аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований под действием ультрафиолетового излучения на смесь более простых веществ. В последнее время эти явления привлекают особое внимание исследователей, так как аналогичные реакции могли совершаться до зарождения жизни на Земле и, более того, они сами могли служить в качестве одного, может быть, главного, источника происхождения жизни, обеспечивая первоначальный синтез нуклеиновых кислот, белков и т. п. (абиогенный синтез биологически важных соединений).

К другой группе фотобиологических процессов можно отнести процессы, не связанные с увеличением энергии системы и химическим синтезом, такие, как зрение животных, фототаксис, фототропизм и фотопериодизм растений. Роль этих процессов заключается в получении информации, источником которой служат различные параметры излучения. Животным такая информация дает возможность ориентироваться в окружающей обстановке, а растения получают возможность быстро приспосабливаться к изменениям характера солнечной радиации и регулировать периодический (суточный, сезонный) ритм жизненных процессов (явления фотопериодизма).

В случае зрительного процесса промежуточным звеном между приемником света (зрительными палочками и колбочками) и мозгом служит генерация биоэлектрических импульсов, возникающих вследствие фотохимических реакций зрительных пигментов. Фототропические и фотопериодические реакции растений приводятся в движение открытой недавно особой пигментной системой, поглощающей в красной и инфракрасной областях спектра. Сложные и вместе с тем строго закономерные явления движения растения навстречу солнцу, суточный ритм, цветение растений имеют в своей основе относительно простой фотобиологический процесс, регулируемый пигментной (так называемой фитохромной) системой.

К третьей группе процессов могут быть отнесены те, результатами которых являются поражение живой структуры, деструкция биологически важных веществ, подавление жизнедеятельности. Все эти вредные воздействия возникают, главным образом, при поглощении наиболее крупных порций лучистой энергии, т. е. при облучении организмов коротковолновым ультрафиолетовым излучением. Поглощение квантов излучения нуклеиновыми кислотами вызывает изменение в аппарате, ответственном за клеточное деление и размножение, поглощение квантов белками приводит к их инактивации и нарушению ферментативной активности. Деструктивные процессы, как правило, более просты, чем перечисленные выше приспособительные специализированные фотобиологические процессы, однако они протекают в сложных условиях внутриклеточной среды и поэтому также сопряжены со многими химическими, биохимическими и другими реакциями.

Известны и другие, еще менее исследованные фотобиологические явления самого разнообразного характера, например стимулирующее действие света на развитие животных. Благодаря развитию экспериментальной фотобиологии открыты фотодинамическое действие (поражение клеток видимым светом в присутствии кислорода и красителя), фотореактивация (т. е. снятие поражающего эффекта ультрафиолетового облучения при последующем освещении видимым светом) и т. д., но пока эти процессы еще мало исследованы с точки зрения их общебиологического значения. К последним относится также очень интересное явление «сверхслабого свечения» биологических объектов, когда излучение не поглощается, а наоборот, возникает в ходе биохимических реакций.

Таким образом, даже беглый обзор основных фотобиологических процессов говорит об их чрезвычайном многообразии и специфичности, как по распространенности среди той или иной группы организмов, так и по биологическому значению (биосинтез, зрительная информация, регуляция роста и развития, деструкция биологических структур и их восстановление). В чем же сходство этих процессов? Существует ли нечто общее во всех этих явлениях, нечто такое, что дало бы возможность найти общие принципы для их изучения и анализа их механизма? Оказывается, такая общая основа существует. Эта общность заключается в глубоком сходстве самых первых этапов всех фотобиологических процессов — их фотофизических и фотохимических стадий.

Механизм первичных фотофизических и фотохимических стадий фотобиологических процессов служит предметом, изучаемым в этом разделе биофизики.

ОСНОВНЫЕ СТАДИИ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Первые этапы фотобиологического процесса — это чисто физические акты — поглощение кванта излучения молекулой пигмента или другого вещества, которое приводит к ее возбуждению, т. е. запасанию энергии внутри молекулы. Этот процесс обратим — молекула может за очень короткое время (10^{-12}—10^{-8} *сек*) растратить запасенную энергию в тепло или высветить квант люминесценции и перейти в исходное состояние. Иногда молекула переходит в более долгоживущее, так называемое, триплетное состояние. Возбужденная молекула способна вступать в фотохимические реакции, которые в темноте термодинамически невозможны. Вступая во взаимодействие с окружающими молекулами, воспринимая или отдавая электрон, возбужденная молекула превращается в радикал или ион-радикал. Этот процесс может осуществляться в ходе обычной химической реакции путем диффузии молекул и их реакции в растворе. Однако в некоторых случаях донор

и акцептор электрона находятся в непосредственной близости друг от друга или даже образуют комплекс. В этом случае электрон может быть передан без диффузии молекул (перенос электрона). Передача (обмен) электрона представляет собой элементарный окислительно-восстановительный процесс, в результате которого происходит образование фотовосстановленного или фотоокисленного фотопродукта — первичного восстановителя или первичного окислителя. Эти продукты являются фактически конечным итогом первичных стадий процесса. Обладая высокими окислительно-восстановительными потенциалами, они способны (уже в темноте!) осуществлять окислительно-восстановительные реакции, вступая в сопряжение с темновыми химическими и биохимическими (ферментативными) процессами. Естественно, что разделение на фотофизические и фотохимические стадии в значительной мере условно, однако ряд экспериментальных подходов дает возможность выделять основные стадии фотофизического и фотохимического первичного процесса и сопряженные с ними биохимические реакции.

Поглощение света

Согласно основному закону фотохимии, который является следствием закона сохранения энергии, фотохимическое действие может оказывать только тот свет, который поглощается данной системой. Поэтому для рассмотрения энергетики фотобиологического процесса необходимо знать поглощательную способность системы. В этом отношении наиболее существенны два фактора: 1) общее количество поглощаемой энергии или число квантов, поглощаемых в единицу времени и 2) величина поглощаемого кванта. Первый фактор определяет возможное число реакций, совершающихся в единицу времени, т. е. скорость процесса. Второй фактор определяет энергетику самой фотореакции. Сведения о величине поглощаемых квантов дает спектр поглощения. Вместе с тем его исследование позволяет выяснить, какое вещество ответственно за поглощение света, т. е. идентифицировать вещество, которое первым вовлекается в фотобиологический процесс.

Общие закономерности поглощения. Поток световых квантов, проходя через систему, содержащую молекулы вещества, ослабляется вследствие того, что часть квантов захватывается (поглощается) этими молекулами. Естественно, что число таких «встреч» квантов с молекулами (или вероятность поглощения) пропорционально числу молекул на пути светового потока (или концентрации молекул) и длине оптического пути. С другой стороны, оно должно быть также пропорционально количеству квантов, проходящих через систему в единицу времени, т. е. интенсивности светового потока. Эта закономерность, являющаяся следствием статистической природы поглощения, выражается законом Ламберта —

Бера:

$$-dI = k \cdot I \cdot c \cdot dl. \qquad (11.1)$$

Здесь dI — изменение интенсивности потока, проходящего через тонкий слой вещества (знак минус означает, что свет поглощается), I — интенсивность падающего света, c — концентрация поглощающих молекул, dl — длина оптического пути, т. е. толщина слоя и, наконец, k — коэффициент поглощения, характеризующий поглощательную способность молекул данного типа и зависящий от длины волны поглощаемого света.

Интегрирование этого выражения (т. е. переход к слоям конечной толщины) и переход к десятичным логарифмам позволяет

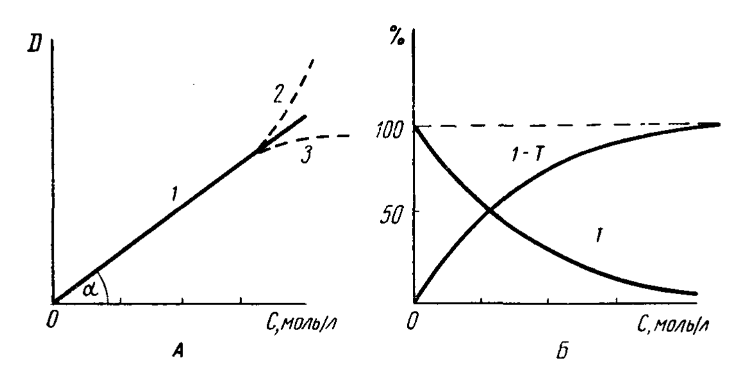


Рис. 100. Основные закономерности поглощения света. *А* — зависимость оптической плотности от концентрации:
1 — линейный участок, *2*, *3* — отклонение от линейной зависимости
Б — Изменение пропускания (T) и поглощения ($1 - T$) при увеличении концентрации

получить из выражения (11.1) соотношение между интенсивностью падающего (I_0) и прошедшего через образец (I) света в более удобной для экспериментатора форме:

$$\lg \frac{I_0}{I} = D = \varepsilon \cdot c \cdot l. \qquad (11.2)$$

Логарифм отношения $\frac{I_0}{I}$, называемый оптической плотностью образца D, таким образом прямо пропорционален молярной концентрации поглощающего вещества и длине оптического пути (толщине слоя). Графически зависимость оптической плотности (D) от концентрации вещества (c) при $l = 1$ *см* изображается в виде прямой, тангенс угла наклона которой к оси абсцисс равен молярному коэффициенту поглощения ε (рис. 100). Молярный коэффициент поглощения — основная величина, характеризующая поглощательную способность молекул данного вещества. Его физический

смысл можно представить себе, если обратить внимание на его размерность. Можно показать, что молярный коэффициент поглощения пропорционален эффективной для поглощения площади поперечного сечения одного моля молекул, которая представляет собой сумму эффективных площадей отдельных молекул. Прохождение кванта через такую площадь (сечение поглощения $= s$) всегда приводит к его поглощению. Экспериментально молярный коэффициент поглощения может быть определен, как оптическая плотность образца толщиной в 1 *см* при концентрации 1 *моль/л* ($\varepsilon = \frac{D}{c \cdot l}$; $\varepsilon = D$ при $c = 1$, $l = 1$). Зная величину молярного коэффициента поглощения, можно оценить количество света, поглощаемого системой. Измеряя величину коэффициента поглощения при различных длинах волн монохроматического света, находят зависимость поглощения от длины волны $D = f(\lambda)$ или $\varepsilon = f(\lambda)$, т. е. определяют спектр поглощения вещества.

Важно подчеркнуть существенную особенность коэффициента поглощения: он не зависит (в определенных пределах) ни от концентрации поглощающих молекул, ни от интенсивности падающего света.

Первая особенность означает, что наклон прямой на графике рис. 100, *А* будет одинаков в широком пределе концентрации — относительное количество света, поглощаемое каждой молекулой, не зависит от присутствия соседней молекулы. Это обстоятельство определяется статистическим характером процесса поглощения — каждая молекула поглощает кванты света независимо от другой молекулы.

Однако это положение не абсолютно: при увеличении концентрации вещества выше определенного предела молекулы начинают взаимодействовать друг с другом, поэтому и акт поглощения теряет свою автономность. При этом по сути дела возникают новые поглощающие центры с другим ε. Число таких центров возрастает с увеличением концентрации и вследствие этого нарушается прямолинейный ход зависимости оптической плотности образца от концентрации. Экспериментальные исследования показывают, что при увеличении концентрации красителей или пигментов в растворе прежде всего образуются димеры, т. е. агрегаты, состоящие из двух молекул; при дальнейшем увеличении концентрации могут образовываться более крупные агрегаты. Таким образом, в этих случаях коэффициент поглощения будет отражать как поглощательную способность отдельных молекул, так и поглощение димеров, которое может быть больше или меньше этой величины. Если поглощение димеров (в расчете на одну молекулу) более эффективно, то кривая отклонится вверх, если менее — то вниз. Исследование отклонений от закона Ламберта — Бера важно для изучения взаимодействия между молекулами поглощающего вещества в живой клетке и в модельных системах. Напри-

мер, оказывается возможным проследить образование агрегатов в концентрированных растворах хлорофилла.

Поглощательная способность молекул в определенных пределах не зависит и от интенсивности света. Это важное свойство позволяет, в частности, измерять поглощение, не заботясь о величине интенсивности измеряемого (и падающего на образец) света, т. е. проводить измерение на спектрофотометрах с различными источниками света и при различной ширине щели. Оптическая плотность будет одинаковой при какой бы интенсивности света ее ни измеряли. Это свойство поглощения определяется тем обстоятельством, что молекула очень быстро «освобождается» от поглощенного кванта света, переходя в исходное состояние. Поэтому поглощение следующего кванта не зависит от того, когда был поглощен предыдущий, не зависит от частоты актов поглощения, т. е. от интенсивности светового потока. Это положение так же, как и предыдущее, не абсолютно, и границы его применимости прежде всего определяются длительностью пребывания молекулы в измененном возбужденном состоянии после поглощения кванта света. Если длительность возбужденного состояния увеличивается от 10^{-8} до 10^{-4} *сек*, то второй квант может «застать» молекулу в измененном состоянии, которое по поглощательной способности может отличаться от исходного состояния как по величине поглощения, так и по его зависимости от длины волны, т. е. по спектру. Количество таких ситуаций естественно будет возрастать и с увеличением интенсивности светового потока (частоты следования квантов). Поэтому исследования изменений поглощения вещества под действием мощных световых вспышек (флешфотолиз) служит эффективным способом для изучения очень быстрых первичных процессов (10^{-9}—10^{-2} *сек*), происходящих в молекуле при поглощении света (см. стр. 318). Если время жизни молекулы в возбужденном состоянии будет еще более значительным (порядка нескольких секунд), то интенсивность света будет сказываться на результатах измерения спектров поглощения и при использовании обычных источников света, например, ярких ламп накаливания или ксеноновых ламп. Так, «насыщение» поглощательной способности молекулы проявляется при изучении поглощения замороженных и охлажденных до 77° К растворов белков и ароматических аминокислот, молекулы которых в этих условиях могут переходить в триплетное состояние с длительностью жизни 3—8 *сек*.

До сих пор речь шла о поглощении света системой однородных молекул, тогда как биологические системы представляют собой сложные многокомпонентные смеси. Общая величина оптической плотности такой системы представляет собой сумму оптических плотностей составляющих ее компонентов: $D_{общ} = D_1 + D_2 + \ldots + D_n$. Аддитивность (суммирование) оптических плотностей так же, как перечисленные выше свойства поглощения,

связаны с независимостью поглощения света каждым компонентом.

Определение молярного коэффициента поглощения и оптической плотности дает возможность оценить поглощательную способность объекта и ее связь с концентрацией молекул. Однако для оценки количества поглощенной световой энергии удобнее воспользоваться другим выражением закона поглощения света, в которое входит величина пропускания (T). Пропускание непосредственно измеряется фотометром и отражает относительную интенсивность света, прошедшего через систему без поглощения:

$$T=\frac{I}{I_0}, \tag{11.3}$$

где I_0 — интенсивность падающего света, а I — интенсивность света, пропущенного объектом. Величина Т может изменяться от 0 (объект полностью поглощает падающий свет $I = 0$) до 1 (свет проходит через систему, не поглощаясь $I = I_0$). Часто величину T выражают в процентах (от 0 до 100%). Пропускание легко определяется, исходя из измерений отношения интенсивности света, падающего на фотоэлемент или фотоумножитель без объекта (I_0) и с объектом (I). Измерения пропускания проводятся на спектрофотометре (прибор с монохроматором) или фотометре (с использованием светофильтров).

Измерив пропускание, можно определить долю поглощенного системой света $\frac{I-I_0}{I_0} = \left(1 - T\right)$. Эта величина может изменяться от 0 — поглощение отсутствует ($T = 1$) до единицы (полное поглощение всего падающего света (Т = 0). Поглощение также может быть выражено в процентах — от 0 до 100% соответственно. Зная интенсивность падающего света и долю поглощения, можно вычислить количество света, поглощаемого системой за единицу времени ($I_{погл} = I_0 - I$).

$$I_{погл}=I_0(1-T). \tag{11.4}$$

Каким же образом количество поглощаемой в единицу времени энергии связано с концентрацией вещества, его поглощающей способностью и длиной оптического пути?

Для ответа на этот вопрос необходимо найти связь пропускания и поглощения с оптической плотностью объекта (D):

$$D=\lg\frac{I_0}{I}=\lg\frac{1}{T}=-\lg T; \quad T=10^{-D},$$

поскольку $D=\varepsilon\cdot c\cdot l$, то $T=10^{-\varepsilon\cdot c\cdot l}$. (11.5)

Графически зависимость пропускания от концентрации изображается кривой, приведенной на рис. 100, *Б*. Из графика видно, что пропускание уменьшается не прямо пропорционально концентрации, а более резко (по экспоненциальному закону). Так, при

увеличении оптической плотности образца от 1 до 2 (т. е. при изменении концентрации в два раза) пропускание уменьшается в 10 раз, при изменении D от 1 до 3 пропускание уменьшается в 100 раз и т. д.

Исходя из соотношения (11.5), можно также найти зависимость поглощения $(1 - T)$ от концентрации и длины оптического пути:

$$1 - T = 1 - 10^{-D} = 1 - 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}. \qquad (11.6)$$

Графически эта зависимость изображена кривой — на рис. 100, *Б*. Из графика видно, что в отличие от оптической плотности доля поглощенного света лишь в самом начальном участке

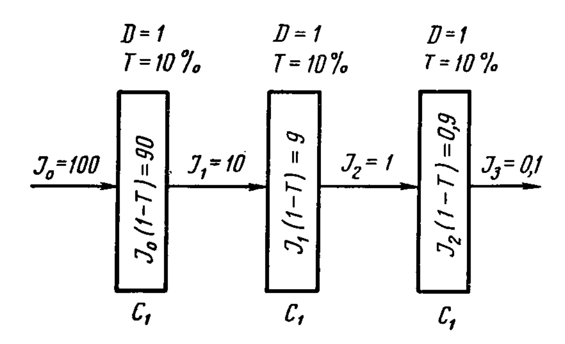


Рис. 101. Поглощение света различными слоями объекта:
Объяснение см. в тексте

(при $D \leqslant 0{,}1$—$0{,}2$) линейно увеличивается с увеличением концентрации, т. е. пропорциональна концентрации. При дальнейшем увеличении концентрации изменение поглощения отстает от изменения концентрации и кривая ассимптотически приближается к определенному пределу (1), который соответствует полному поглощению: $(1 - T) \to 1$, $(T \to 0)$.

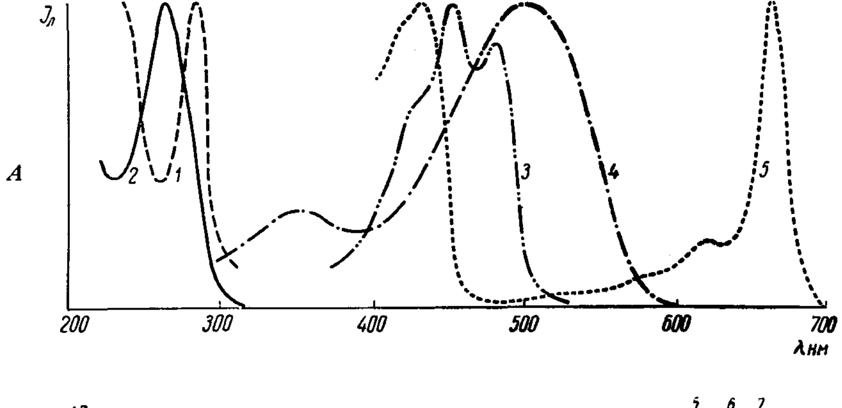
Такой характер зависимости поглощения от концентрации необходимо учитывать при оценке энергии, поглощенной при фотобиологическом процессе. Увеличение концентрации поглощающего свет вещества (например, пигмента) только в определенных пределах существенно сказывается на увеличении поглощения. Так, если система поглощает 90% падающего света (оптическая плотность $D = 1$), то даже двукратное повышение концентрации пигмента ($D = 2$) увеличит количество поглощаемого света меньше, чем на 10% (до 99%). Во многих случаях важно знать распределение поглощения в разных слоях поглощающего свет объекта. Если мысленно разделить весь объем однородного образца (например, кювету с раствором) на три слоя равной толщины, то, поскольку концентрация вещества в слое и толщина слоев одинаковы, опти-

ческие плотности слоев также будут равными:

$$D_1 = D_2 = D_3 = \frac{D_{\text{общ}}}{3} = 1 \text{ (рис. 101)}.$$

Естественно, что величина пропускания T также одинакова для всех трех слоев (каждый слой пропускает одну и ту же долю падающего на него света, в данном случае $T = 10\%$). Однако количество света, поглощенного в каждом слое, не будет одинаковым. Так, первый слой поглотит 90% падающего света, что соответствует 90 единицам: $100(1 - T) = 90$. Второй слой поглотит также 90% падающего на него света, но так как на этот слой падает только тот свет, который пропущен первым слоем ($100 - 90 = 10$ единиц), то количество поглощенной энергии будет значительно меньше $10(1 - T) = 9$ *ед*.

Наконец, третий слой поглотит только 0,9 *ед* световой энергии. Таким образом, доля каждого слоя в общем поглощении будет



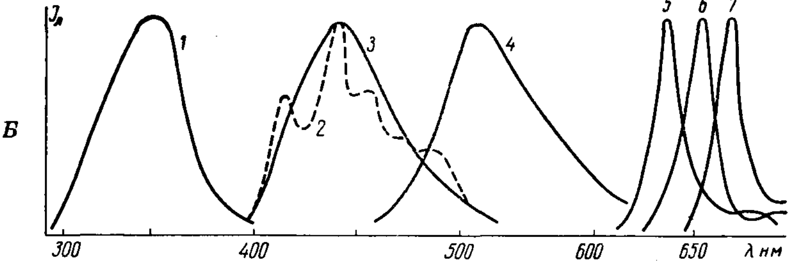


Рис. 102. *А* — спектры поглощения некоторых биологически важных соединений:

1 — белок, 2 — ДНК, 3 — β-каротин, 4 — родопсин, 5 — хлорофилл *a*;

Б — спектры люминесценции:

1 — белок (флуоресценция), 2 — белок (послесвечение при —196° С), 3 — пиридиннуклеотиды, 4 — флавины, 5 — протохлорофилл, 6 — хлорофилл *b*, 7 — хлорофилл *a* По оси абсцисс — длины волн в *нм*, по оси ординат — поглощение (D) или интенсивность люминесценции ($I_л$) в относ. ед.

резко различной, в основном поглощение происходит в самых передних, обращенных к падающему свету слоях. Это обстоятельство необходимо учитывать при проведении фотохимических исследований (равномерное освещение достигается при малой величине поглощения образца).

Спектры поглощения. Как упоминалось выше, спектром поглощения называется зависимость величины поглощения (которая выражается в единицах оптической плотности или коэффициентом поглощения) от длины волны (или частоты) падающего на объект излучения. На рис. 102, *А* приведены спектры поглощения некоторых биологически важных соединений, ответственных за поглощение в видимой и ультрафиолетовой областях. Как видно из рисунка, кривые спектров поглощения имеют иногда довольно сложный вид, характерный для данного вещества. Существуют также области, где вещество не поглощает света (например, белки в видимой части спектра — 400—750 *нм*). Селективный, избирательный характер поглощения связан с тем, что за поглощение в ультрафиолетовой и видимой областях ответственны определенные группы, входящие в состав сложных молекул и называемые хромофорными группами. Свойство поглощать свет определенной длины волны связано с особенностями строения этих групп, которые, как правило, представляют собой системы с сопряженными двойными связями (часто циклические, ароматические системы). Ниже приведено строение некоторых хромофорных групп.

Хлорофилл *а*

Протохлорофилл

Ароматические аминокислоты белков

Триптофан

Фенилаланин

Тирозин

$R = CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Селективность поглощения хромофоров сложных молекул по своей природе аналогична селективности поглощения отдельных

атомов вещества. Как известно, это свойство атомов поглощать излучение строго определенной длины волны связано с существованием строго определенных энергетических уровней, на которых могут находиться электроны в атоме. Переход между уровнями совершается при поглощении только таких дискретных порций (квантов) излучения, величина которых соответствует расстоянию между электронными уровнями (по шкале энергии). Поэтому спектр поглощения атомов состоит из ряда линий, положение которых в спектре (длина волны или частота) соответствует энергии поглощаемого кванта, т. е. расстоянию между электронными уровнями в атоме.

В биологии приходится иметь дело с гораздо более сложными системами, поскольку хромофорные группы состоят часто из десятков, а иногда и из сотен атомов. Поэтому анализ процессов поглощения света и интерпретация спектров поглощения сложных молекул значительно усложняется. Однако имеются достаточные основания для того, чтобы и в этом случае рассматривать явление поглощения света как процесс, связанный с переходом одного из электронов в молекуле с энергетически более низкого на более высокий уровень. Нижний уровень (S_0) соответствует молекуле в невозбужденном основном состоянии (до поглощения света); верхний уровень (S^*) — молекуле в возбужденном состоянии. Расстояние между уровнями по шкале энергии так же, как в случае отдельного атома, соответствует величине поглощенного кванта (рис. 103, *А*).

Энергия поглощаемого кванта должна в точности соответствовать расстоянию между уровнями. Кванты иной величины поглощаться не будут.

Энергия кванта связана с длиной волны излучения следующей зависимостью: $E = h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$, где $h = 6{,}625 \cdot 10^{-27}$ *эрг/сек* — постоянная Планка, $c = 2{,}998 \cdot 10^{10}$ *см* — скорость света и λ — длина волны излучения. Учитывая, что 1 *нм* = 10^{-9}*м* = 10^{-7} *см*, а 1 *эв* = $1{,}602 \cdot 10^{-12}$ *эрг*, можно приближенно вычислить энергию кванта в электронвольтах по формуле

$$E_{[эв]} = \frac{1244}{\lambda_{[нм]}} .$$

Энергия, соответствующая одному молю квантов, равна 1 эйнштейну (N квантов, где N — число Авогадро = $6{,}023 \cdot 10^{23}$), может быть выражена в джоулях (1 *дж* = 10^7 *эрг*) или килокалориях (1 *кал* = 4,184 *дж*):

$$E_{[дж/моль]} = \frac{11\,970}{\lambda_{[нм]}} \cdot 10^7; \quad E_{[ккал/моль]} = \frac{28\,650}{\lambda_{[нм]}} .$$

Эта величина соответствует увеличению энергии одного моля молекул, если каждая из молекул поглотит квант излучения данной длины волны. Таким образом, энергия кванта коротковолнового ультрафиолетового излучения — 200 *нм* равна 6,2 *эв* (соответственно 143 *ккал/моль*). Область видимого излучения соответствует энергии кванта от 3,1 *эв* или 71,6 *ккал/моль* (400 *нм*) до 1,66 *эв* или 38,2 *ккал/моль* (750 *нм*). Поскольку энергия кванта обратно пропорциональна длине волны, то, запомнив значение энергии для

какой-либо одной длины волны, λ_0, легко рассчитать ее для любой другой λ_x. Так, $E_{600нм} = E_{400нм} \cdot \frac{400}{600} = 3{,}11 \cdot \frac{2}{3} = 2{,}07$ *эв*. В более общей форме: $E_{\lambda_x} = E_{\lambda_0} \cdot \frac{\lambda_0}{\lambda_x}$.

Переходы между энергетическими уровнями молекулы изображены на рис. 103, *А*. При поглощении кванта света молекула переходит из основного состояния (S_0) в возбужденное состояние

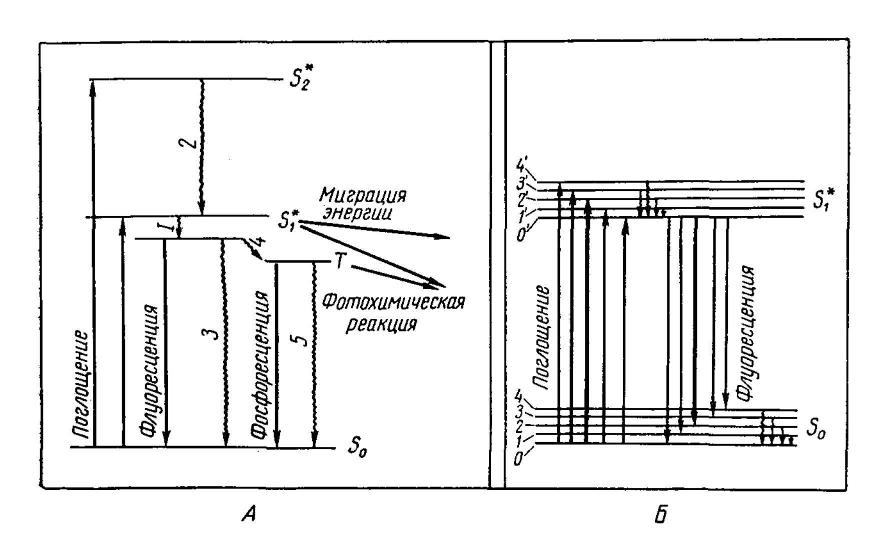


Рис. 103. Энергетические уровни молекул и переходы между ними. *А* — поглощение и растрата энергии кванта: S_0 — основной (невозбужденный) синглетный уровень, S_1^* — первый возбужденный синглетный уровень, S_2^* — второй возбужденный синглетный уровень, *T* — триплетный уровень.

1, 2, 3, 4, 5 —растрата энергии в тепло

Б — переходы между уровнями при поглощении и люминесценции: S_0 — невозбужденный электронный уровень, S_1^* — возбужденный электронный уровень

0, 1, 2, 3, 4 — колебательные подуровни энергии. Прямые стрелки — поглощение и люминесценция, волнистые — растрата энергии в тепло

(S_1^*) или (S_2^*). Этим электронным переходам должны соответствовать две резкие линии в спектре поглощения, а спектр сложной молекулы в целом должен состоять из отдельных линий, каждая из которых соответствует одному электронному переходу, в данном случае $S_0 \to S_1^*$ и $S_0 \to S_2^*$). Однако в действительности, в отличие от атомных спектров, спектр поглощения сложных молекул является сплошным (непрерывным). Это обусловлено тем, что в акте поглощения кванта, помимо увеличения электронной энергии, молекула получает избыток колебательной энергии, связанный

с изменением расстояния между отдельными ее атомами. Поскольку энергия колебания также квантована, каждому электронному уровню молекулы сопутствует ряд колебательных подуровней (*0*, *1*, *2*, *3*, *4* на рис. 103, *Б*), расстояние между которыми гораздо меньше, чем расстояние между электронными уровнями. Переходы «вверх» непосредственно между колебательными подуровнями уровня S_0 — 0, 1, 2, 3, 4 происходят при поглощении квантов инфракрасного излучения. (Следует оговориться, что поскольку колебательные подуровни в данной молекуле также соответствуют вполне определенным дискретным значениям энергии, то их наличие само по себе может привести лишь к сильному усложнению спектра, который, однако, должен сохранить линейчатый характер). Это и в самом деле имеет место для спектров поглощения молекул в газообразной фазе или растворов, замороженных до температуры жидкого азота в некоторых нейтральных растворителях, например предельных углеводородах (эффект Шпольского). Однако для подавляющего большинства растворов характерны не линейчатые (хотя бы и сложные), а истинно сплошные «размытые» спектры поглощения. Это объясняется взаимодействием молекул с растворителем, характер которого несколько различен для разных молекул.

Когда молекула находится в основном (невозбужденном) электронном состоянии, то при комнатной температуре возбуждены лишь самые низкие колебательные подуровни (за счет теплового движения). Именно с этих уровней и начинается электронный переход при поглощении кванта света. Однако заканчиваться электронный переход в общем случае будет не на нижнем колебательном подуровне верхнего электронно-возбужденного состояния, а на каком-либо из более высоких колебательных подуровней (*1*, *2*, *3*, *4*). Иначе говоря, вместе с избытком электронной энергии (E) молекула получает избыток колебательной энергии (ΔE). Вероятность перехода на данный колебательный подуровень зависит от структуры молекулы, ее симметрии и ряда других свойств. Бо́льшая вероятность перехода соответствует большей вероятности поглощения кванта данной величины, т. е. поглощению излучения данной длины волны. Наиболее вероятные переходы будут соответствовать максимальному коэффициенту поглощения, т. е. максимуму в спектре поглощения. Часто (но далеко не всегда) главные максимумы поглощения в спектре соответствуют переходам, близким к чисто электронным переходам (на колебательные подуровни, расположенные близко к основному электронному уровню). Поэтому по положению основных максимумов поглощения можно примерно определить расположение возбужденных уровней в молекуле и их подуровней.

Так, например, два основных максимума в спектре поглощения хлорофилла в клетке ($\lambda_{макс}$ = 430 *ммк* и $\lambda_{макс}$ = 680 *ммк*) соответствуют переходам на два различных электронных уровня.

Другие максимумы в спектре этого пигмента соответствуют переходам на колебательные подуровни электронных уровней; по расстоянию между ними можно определить энергию, связанную с возбуждением колебаний молекулы. В спектре поглощения ароматических аминокислот, которые определяют спектр поглощения

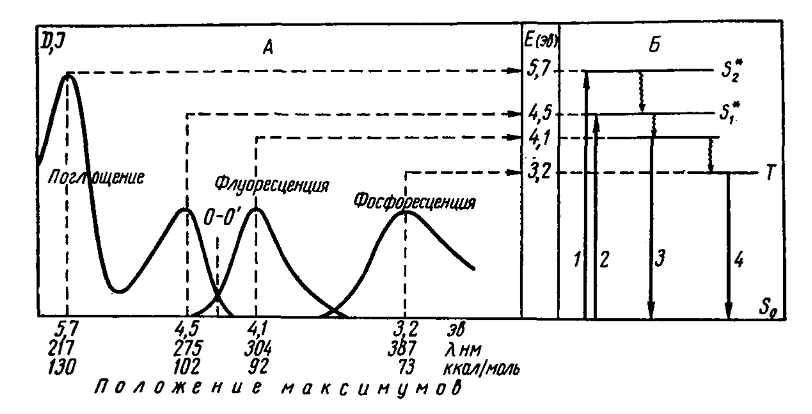


Рис. 104. Построение схемы электронных энергетических уровней молекулы на основании изучения спектров поглощения и люминесценции: *А* — спектры поглощения, флуоресценции и фосфоресценции тирозина; 0—0′ — длина волны, соответствующая чисто электронному переходу; *Б* — схема уровней:

1 и *2* — переходы, соответствующие поглощению в максимуме 217 и 275 *нм*, *3* — переход, соответствующий флуоресценции с максимумом 304, *4* — переход, соответствующий фосфоресценции — максимум 387 *нм* (по Владимирову)

белка в области 220—280 *ммк*, также можно определить положение двух электронных уровней, соответствующих главным максимумам поглощения (рис. 104).

Таким образом, исследование спектров поглощения дает возможность определить положение основных электронных уровней возбуждения молекулы и колебательную структуру этих уровней (расположение колебательных подуровней и вероятности перехода на них).

Люминесценция

Переход молекулы в возбужденное состояние можно рассматривать как акт запасания энергии кванта света в молекуле. Однако эта энергия имеет тенденцию весьма быстро растратиться. Прежде всего происходит растрата той части энергии, которая представляет собой избыток по отношению к самому нижнему подуровню наиболее низкого электронного уровня (переходы $S_2^* \to S_1^*$ и $4 \to 0$; $3 \to 0$; $2 \to 0$; $1 \to 0$; $S_2^* \to S_1^*$ и $4' \to 0$; $3' \to 0$; $2 \to 0$; $1 \to 0$). При этом энергия растрачивается в тепло и отдается

окружающей среде. Процесс растраты происходит чрезвычайно быстро — за время 10^{-13}—10^{-11} *сек*. Таким образом, молекула, поглотившая квант энергии любой величины, через короткое время оказывается на самом нижнем уровне возбуждения. Дальнейшая растрата энергии происходит более медленно. Средняя величина длительности жизни молекулы в нижнем синглетном возбужденном состоянии (S_1^*) составляет около 10^{-9}—10^{-8} *сек*. Энергия, запасенная на этом уровне, может быть растрачена в тепло (безизлучательный переход $S^* \rightarrow S_0$), либо быть высвечена в виде кванта излучения (флуоресценция, переход $S^* \rightarrow S_0$), либо, наконец, быть использована для осуществления фотохимической реакции (см. рис. 103, *А* и *Б*).

Флуоресценция. Излучение квантов молекулами при переходе с возбужденного синглетного уровня на основной $S_1^* \rightarrow S_0$ называется флуоресценцией. Так как длительность жизни молекул в синглетном возбужденном состоянии весьма мала (10^{-8}—10^{-9} *сек*), то люминесценция этого типа наблюдается только непосредственно во время освещения объекта (в отличие от фосфоресценции и других видов послесвечения, которые затухают более медленно и могут регистрироваться и после выключения возбуждающего света). В связи с этим при измерении флуоресценции необходимо отделять ее от рассеянного возбуждающего света. Измерения флуоресценции проводят, освещая объект через светофильтр, который пропускает свет, поглощаемый объектом, и не пропускает излучения в спектральной области флуоресценции (иначе бы оно смешивалось с флуоресценцией). После объекта помещают светофильтр, пропускающий только люминесценцию. Так, красную флуоресценцию хлорофилла удобно наблюдать, освещая объект (зеленый лист растения, раствор пигмента) через синий светофильтр, пропускающий синий свет в области коротковолнового максимума хлорофилла (400—500 *нм*) и не пропускающий красных лучей. После объекта ставят красный светофильтр, выделяющий флуоресценцию. При исследовании веществ, люминесцирующих в видимой области, часто используют ультрафиолетовые светофильтры («черное стекло»), прозрачные для ультрафиолета и не пропускающие излучения в видимой области. Ультрафиолетовую флуоресценцию белков (максимумы в области 340—360 *нм*) возбуждают через светофильтры, непрозрачные в этой области, но пропускающие более короткий ультрафиолет, поглощаемый белком (200—280 *нм*), например светофильтр Бекштрема. Во всех случаях после флуоресцирующего объекта помещают второй светофильтр, выделяющий люминесценцию.

Для того чтобы измерить спектр люминесценции, после объекта помещают монохроматор, на щель которого фокусируют люминесценцию. На выходе монохроматора разложенное в спектр излучение измеряют с помощью фотоумножителя и затем строят график зависимости интенсивности люминесценции от длины волны

(см стр. 323). Спектры люминесценции некоторых биологически важных соединений приведены на рис. 102, *Б*.

Как уже упоминалось выше, испускание кванта света флуоресценции происходит с самого нижнего возбужденного уровня независимо от того, на какой уровень был перед этим «заброшен» электрон при поглощении кванта. Это свойство возбужденных молекул имеет принципиальное значение для понимания не только процессов люминесценции, но и для понимания первичного механизма фотобиологического процесса (фотохимических реакций). Проявлением этой закономерности является независимость ни спектра флуоресценции, ни ее эффективности (т. е. вероятности испускания кванта) от длины волны поглощенного света. Действительно, если испускание происходит всегда с одного и того же уровня, то его вероятность зависит только от свойств этого уровня и не должна зависеть от предыстории, т. е. от того, каким способом молекула перешла на этот исходный уровень. Положение о независимости вероятности излучения (квантового выхода люминесценции от длины волны) носит название закона Вавилова.

Независимость спектра люминесценции от длины волны возбуждающего света имеет важное значение для аналитического применения: спектры люминесценции можно измерять при любой длине волны возбуждения (в области поглощения люминесцирующего вещества); так форма спектра люминесценции хлорофилла в растворе остается неизменной при освещении синим и красным светом.

Величина кванта излучаемой флуоресценции может быть различной: каков же спектр этого излучения? Чем определяется распределение интенсивности излучения по длинам волн? Эксперименты показывают, что длина волны люминесценции всегда больше длины волны возбуждающего света, т. е. что излучаемые кванты по своей величине меньше, чем поглощенные. Иначе говоря, на излучение расходуется не вся энергия кванта, часть ее остается в молекуле, увеличивая ее колебательную энергию. Таким образом, переход вниз ($S^* \rightarrow S_0$ см. схему рис. 103, *Б*) заканчивается не на самом нижнем, а на некотором более высоком подуровне. В последующий интервал времени избыток колебательной энергии (ΔE_2) быстро растрачивается в тепло (без излучения), и молекула возвращается на один из нижних колебательных уровней, положение которого определяется температурой среды. Из рассматриваемой схемы, обобщающей экспериментальные данные, можно вывести два следствия:

1. Как видно из схемы, длина стрелок, обозначающих излучательные переходы ($S_1^* \rightarrow S_0$), меньше, чем длина стрелок, изображающих переходы, связанные с поглощением ($S_0 \rightarrow S_1^*$), т. е. величина излучаемых квантов меньше величины поглощенных. Это соотношение обусловлено, как сказано выше, тем, что часть энергии кванта света растрачивается как в верхнем (ΔE_1), так

и в нижнем состоянии (ΔE_2). Отсюда следует, что спектр флуоресценции должен быть сдвинут в сторону бо́льших длин волн по отношению к самому длинноволновому максимуму поглощения. Это положение о длинноволновом смещении спектра люминесценции называется правилом Стокса (стоксовское смещение).

2. Форма спектра люминесценции, т. е. зависимость интенсивности излучения от длины волны (распределение излучаемых квантов по величине их энергии), определяется вероятностью перехода на данный колебательный подуровень основного уровня и относительного расположения подуровней основного состояния. Максимальной вероятности будет соответствовать длина волны максимума в спектре флуоресценции. Эксперименты показывают, что спектр флуоресценции по шкале частот, как правило, симметричен по форме длинноволновой полосе спектра поглощения (правило Левшина). Это означает, что распределение колебательных подуровней молекулы в основном состоянии аналогично их распределению в возбужденном состоянии. Таким образом, спектр флуоресценции располагается непосредственно за самым длинноволновым максимумом спектра поглощения и по форме симметричен с этим максимумом.

Еще раз следует подчеркнуть, что ни положение спектра флуоресценции индивидуального вещества, ни его форма не зависят от длины волны возбуждающего света.

Так для хлорофилла, а при любой длине волны возбуждающего света известна лишь красная люминесценция (спектр которой расположен в более длинноволновой области, чем длинноволновый максимум поглощения — в растворе 660—670 *нм*) и не обнаружено люминесценции в синей области спектра, которая соответствовала бы синему максимуму поглощения.

Понятно, что для смеси двух люминесцирующих веществ положение усложняется; поскольку соотношения поглощения этих веществ различны при разных длинах волн, то и относительная интенсивность их люминесценции (а значит, и суммарный спектр люминесценции) будет зависеть от длины волны возбуждения. Зависимость спектра люминесценции от длины волны возбуждающего света часто служит критерием того, что в системе имеется более одного люминесцирующего вещества.

Триплетный уровень и фосфоресценция. Давно замечено, что многие вещества (особенно при низкой температуре) продолжают интенсивно светиться даже после выключения света. В случае молекул, находящихся в растворе, это послесвечение обусловлено переходом с так называемого триплетного уровня, который расположен несколько ниже синглетного возбужденного уровня. В отличие от флуоресценции, наблюдаемой лишь при освещении, этот тип люминесценции называется фосфоресценцией. Положение триплетного уровня устанавливается, исходя из измерений спектра фосфоресценции (послесвечения), который смещен в длин-

новолновую сторону по отношению к спектру флуоресценции. Так, например, флуоресценция белков обнаруживается в ультрафиолетовой области, а их послесвечение при низкой температуре наблюдается в фиолетовой и синей части спектра (см. рис. 102, *Б* и 104). Большая длительность жизни триплетного состояния обусловлена тем, что переход на этот уровень связан с изменением спина электрона (обращение спина). Будучи спаренными (т. е. имея противоположные спины) в синглетном состоянии (основном и возбужденном), два электрона молекулы становятся неспаренными в триплетном состоянии.

Переходы, связанные с обращением спина, маловероятны (запрещены), поэтому поглощение, соответствующее прямому переходу из основного в триплетное состояние ($S_0 \rightarrow T$) практически обычно не наблюдается — попасть на триплетный уровень электрон может в основном через синглетный возбужденный уровень ($S_0 \rightarrow S^* \rightarrow T$). По этой же причине возвращение электрона с триплетного уровня замедлено. Длительность жизни молекулы в триплетном состоянии на несколько порядков больше, чем в синглетном, — 10^{-7}—10^{-3} *сек* и больше.

Наличие двух неспаренных электронов обусловливает появление парамагнитных свойств триплетных молекул (бирадикал), которые могут быть обнаружены по появлению сигнала ЭПР при освещении образца. Свойства бирадикала и большая длительность жизни молекулы в триплетном состоянии (а следовательно, увеличение вероятности вступления возбужденной молекулы в реакцию с другими молекулами) обусловливают большие потенциальные возможности участия таких молекул в фотопроцессе. Однако, с другой стороны, следует учитывать, что в некоторых условиях стационарная концентрация триплетно-возбужденных молекул может быть на несколько порядков ниже, чем синглетно-возбужденных. Различного типа фотопроцессы могут протекать либо через триплетное, либо через синглетное возбужденное состояние.

Интенсивность люминесценции, квантовый выход и спектры возбуждения люминесценции. Интенсивность люминесценции пропорциональна интенсивности возбуждающего света и поглощению (чем больше квантов поглощается в единицу времени, тем больше и излучается). Если выражать интенсивность люминесценции в количестве квантов, испускаемых за единицу времени ($I_{л}$), то отношение этой величины к количеству поглощаемых за то же время квантов ($I_{погл}$) — квантовый выход люминесценции ($\varphi_{л}$) — есть величина постоянная, независимая от длины волны возбуждающего света. Квантовый выход характеризует эффективность преобразования поглощенных квантов в кванты люминесценции; его величина различна для разных веществ и изменяется также от условий, в которых находится молекула (в той мере, в которой они определяют соотношение вероятности высвечивания кванта

с вероятностью конкурирующих процессов — растраты в тепло или использования для фотохимических реакций). Итак:

$$\frac{\text{Количество квантов люминесценции}}{\text{Количество квантов поглощенных}} = \varphi_л.$$

$$\frac{I_л}{I_{погл}} = \varphi_л \qquad I_л = I_{погл} \cdot \varphi_л. \tag{11.7}$$

Квантовый выход люминесценции может изменяться от единицы (все поглощенные кванты излучаются) до 0 (вещество не люминесцирует вследствие растраты энергии в тепло или на фотохимическую реакцию).

Поскольку интенсивность поглощенного света равна $I_0 (1 - T)$ (см. стр. 322), то интенсивность люминесценции прямо пропорциональна интенсивности возбуждающего света и поглощению:

$$I_л = I_0 (1 - T) \varphi. \tag{11.8}$$

Для аналитических целей используют малые концентрации вещества. В этом случае (при малом поглощении) $(1 - T) \approx D$, следовательно, интенсивность люминесценции пропорциональна оптической плотности или концентрации люминесцирующего вещества

$$I_л \simeq I_0 \cdot c \cdot \varphi_л. \tag{11.9}$$

Каким образом зависит интенсивность люминесценции от длины волны возбуждающего света? Для выяснения этого вопроса измеряют относительную интенсивность люминесценции в зависимости от длины волны возбуждающего света $\frac{I_л}{I_0} = f(\lambda_{возбуж})$. Эта функция, измеряемая в области поглощения люминесцирующего вещества, называется спектром возбуждения люминесценции. Измерения спектра возбуждения проводят, помещая объект на выходе монохроматора и регистрируя интенсивность люминесценции, выделяемой светофильтрами, при различной длине волны падающего возбуждающего света. Полученные показания ($I_л^{\lambda_1}$, $I_л^{\lambda_2}$, $I_л^{\lambda_3}$ ...) делят на интенсивность возбуждающего света ($I_0^{\lambda_1}$, $I_0^{\lambda_2}$, $I_0^{\lambda_3}$ ...) (точнее на величины, пропорциональные количеству падающих квантов в единицу времени) при каждой длине волны. Эти величины заранее определяются с помощью чувствительной термопары или фотоумножителя с известной спектральной чувствительностью. Из формулы очевидно, что $\frac{I_л}{I_0} \simeq (1 - T)\varphi_л$. Поскольку квантовый выход не зависит от длины волны, форма кривой спектра возбуждения определяется вторым сомножителем $(1 - T)$. Отсюда следует, что при небольшой величине поглощения, когда $(1 - T) \simeq D$, спектр возбуждения по форме должен совпадать со спектром поглощения люминесцирующего вещества: $\frac{I_л}{I_0} \simeq D =$

$= f(\lambda)$. Таким образом, измерение спектра возбуждения позволяет определить спектр поглощения вещества по его люминесценции. Если в системе имеется какое-либо вещество *А*, которое поглощает свет, но само не люминесцирует, а передает поглощенную энергию другому веществу *Б*, то в спектре возбуждения люминесценции *В* будут обнаруживаться максимумы, соответствующие как собственному поглощению *Б*, так и поглощению *А*. Таким образом, измерения спектра возбуждения дают возможность исследовать миграцию энергии возбуждения (см. рис. 105).

В общем случае спектр возбуждения люминесценции отражает спектр поглощения веществ, участвующих в люминесценции непосредственно или посредством миграции энергии.

Миграция энергии

Энергия излучения, поглощенная одной молекулой, может быть передана другой, близко расположенной молекуле. Обычный перенос энергии в биологических системах — это диффузия богатых энергией соединений, осуществляющаяся в растворе. Однако в последнее время исследуются и другие пути, имеющие особенно важное значение в фотобиологических, радиобиологических и, возможно, некоторых биохимических процессах и получившие название миграции энергии. Миграция энергии — это безизлучательная передача энергии от молекулы к молекуле или в системе молекул на расстояния, значительно превышающие межатомные, и происходящая без растраты на тепловые колебания и без кинетических соударений донора и акцептора энергии.

Экспериментально миграция энергии между разнородными молекулами может быть обнаружена по появлению сенсибилизированной люминесценции. Так, если в растворе находятся два вещества *А* и *Б*, различающихся по спектру поглощения (спектр вещества *А* расположен в более коротковолновой области), то при некоторых условиях освещение раствора светом, поглощаемым только веществом *А*, вызывает люминесценцию вещества *Б* (сенсибилизированная люминесценция). Эффект сохраняется и при низкой температуре, препятствующей диффузии молекул. Одновременно наблюдается тушение собственной люминесценции вещества *А*. Существование такого процесса может быть установлено, как показано выше, при измерении спектра возбуждения люминесценции вещества *Б* (рис. 105). Эти эффекты есть следствие миграции энергии возбуждения от вещества *А* (донор энергии) к веществу *Б* (акцептор энергии).

Аналогичным образом миграция энергии может быть прослежена по спектрам действия сенсибилизированного фотохимического процесса. Появление в таком спектре максимумов, характерных для поглощения вещества, которое само по себе не участвует в фото-

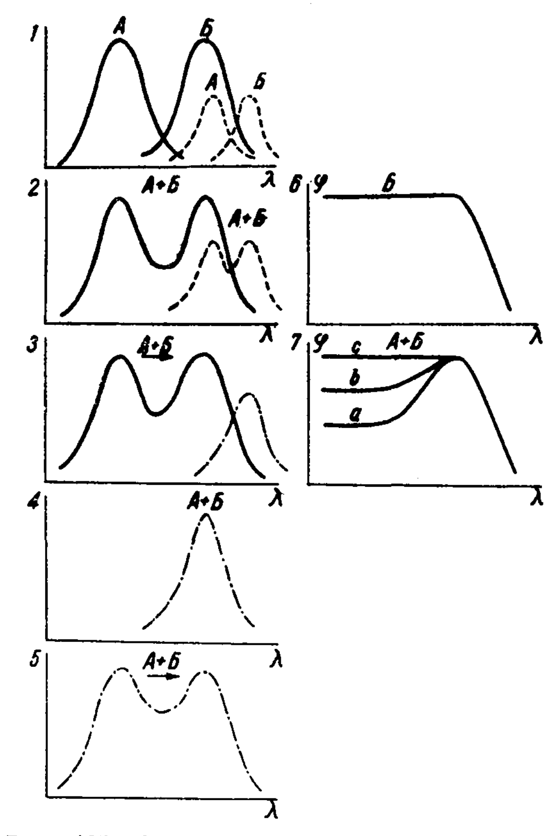


Рис. 105. Схема, иллюстрирующая принципы исследования миграции энергии между молекулами с помощью спектральных методов:

1 — спектры поглощения (сплошная линия) и люминесценции (пунктир) индивидуальных веществ *А* и *Б*; *2* — спектры поглощения и люминесценции смеси веществ *А* + *Б* при отсутствии миграции энергии; *3* — спектры поглощения и люминесценции системы *А* + *Б* при полной миграции энергии от *А* на *Б* (флуоресцирует только вещество *Б*); *4* — спектр возбуждения люминесценции вещества *Б* в смеси (*А* + *Б*) при отсутствии миграции энергии (эффективно только поглощение самой молекулы *Б*); *5* — спектр возбуждения люминесценции вещества *Б* в системе *А* + *Б* в случае миграции энергии от *А* на *Б* (свет, поглощенный обоими веществами, высвечивается в виде люминесценции *Б*); *6* — квантовый выход люминесценции вещества *Б* в отсутствии вещества *А*; *7* — квантовый выход вещества *Б* в системе *А* + *Б*; *a* — в отсутствии миграции энергии от *А* на *Б* (экранирующий эффект за счет поглощения света веществом *А*); *б* — при частичной миграции энергии от *А* на *Б*; *с* — при полной миграции энергии от *А* на *Б*

химической реакции, говорит о миграции энергии с этого вещества на акцептор энергии, осуществляющей процесс ($A + h\nu \rightarrow A^*$; $A^* + B \rightarrow A + B^*$). При этом, однако, нужно быть уверенным, что взаимодействие не осуществляется диффузионным путем, например, при реакции двух фотопродуктов. На последнюю возможность может указывать медленная скорость взаимодействия (секунды), так как миграция практически безинерционна.

Миграция энергии может происходить и между однородными молекулами, в этом случае ее можно обнаружить по тушению люминесценции или по ее деполяризации. Оба явления обусловлены миграцией энергии между сближенными молекулами.

В растворах миграция энергии, как правило, осуществляется по механизму индуктивного резонанса, для функционирования которого необходимы следующие условия:

1. Донор энергии должен обладать способностью к люминесценции.

2. Полоса флуоресценции донора должна перекрываться с полосой поглощения акцептора, иначе говоря, должны совпадать частоты колебаний осцилляторов донора и акцептора. Это условие можно сопоставить с условием резонанса при вынужденных колебаниях механических систем, например, при взаимодействии связанных маятников.

3. Вероятность миграции резко возрастает при сближении молекул (обратно пропорционально шестой степени расстояния). Поэтому эффективная миграция происходит, если донор и акцептор достаточно сближены (100—10 Å), например, в концентрированных растворах или при адсорбции хромофоров на белке.

Миграция энергии возбуждения может осуществляться как по синглетным, так и по триплетным уровням. При взаимодействии разнородных молекул ее направление всегда соответствует переходу с более высокого уровня в доноре на более низкие в акцепторе.

Фотопроцессы в полупроводниковых структурах

Если под действием света возникают заряженные частицы (ионы, ион-радикалы или свободные электроны), то их присутствие может быть обнаружено по электропроводности, увеличивающейся при освещении (фотопроводимость).

Тип проводимости, в частности характер носителей заряда (ионы или свободные электроны), устанавливается при изучении зависимости электропроводности от температуры, вязкости и других параметров. В жидких средах (в растворе поглощающих свет веществ) проводимость обусловливается фотопродуктами типа ион-радикалов или ионов и подчиняется закономерностям, хорошо изученным для электролитов — проводников второго рода. В твердом теле или в структурах, приближающихся к нему по электриче-

ским свойствам, может возникать фотопроводимость полупроводникового типа. Этот тип фотопроводимости характерен для некоторых биологических соединений, получаемых в кристаллическом или агрегированном состоянии с близко расположенными и ориентированными молекулами (кристаллы хлорофилла и каротина, пленки белков). Пока неясно, могут ли обладать полупроводниковыми свойствами сложные биологические структуры, например, такие образования как хлоропласты или зрительные фоторецепторы, однако такая возможность не исключена; уже в настоящее время имеются попытки объяснить целый ряд явлений, происходящих в этих структурах под действием света, с точки зрения теории полупроводников. На рис. 106 сопоставлены свойства проводников и полупроводников.

В случае полупроводников электроны находятся преимущественно в нижней валентной зоне. Проводимость возникает при переходе электронов в верхнюю зону — зону проводимости, по которой они могут свободно перемещаться под действием приложенной разности потенциалов. Поскольку нижняя и верхняя зона разделены и отделены друг от друга запрещенной зоной, то для перехода электронов в зону проводимости необходимо возбуждение электрона, осуществляющееся под действием тепла (темновая проводимость) или при поглощении излучения (фотопроводимость). Ширина запрещенной зоны ΔE может быть определена по характеру температурной зависимости темновой проводимости, а также исходя из данных о красной границе фотопроводимости (минимальная величина кванта, вызывающего фотопроводимость). Из зоны проводимости электроны могут либо очень быстро (10^{-8} *сек*) возвращаться в нижнюю зону, рекомбинируя с дыркой — электронной вакансией, оставшейся в нижней зоне, — этот процесс сопровождается люминесценцией, либо задерживаться на локальных уровнях, расположенных несколько ниже зоны проводимости. Эти уровни (электронные ловушки) связаны с молекулами примеси или нарушениями кристаллической структуры (рис. 106).

Для того чтобы электрону «выбраться» из такой ловушки, ему должна быть сообщена дополнительная энергия, соответствующая расстоянию между уровнем ловушки и зоной проводимости. Выход электрона из ловушки и последующая рекомбинация сопровождаются послесвечением. Такой избыток энергии может быть получен при нагревании проводника или инфракрасном облучении, в этом случае концентрация электронов в зоне проводимости увеличивается и соответственно с этим увеличивается его проводимость. Таким образом, для полупроводников характерно довольно резкое повышение темновой проводимости и фотопроводимости с увеличением температуры по экспоненциальному закону. Известно, что в противоположность этому проводимость проводников уменьшается при нагревании. По температурной зависимости проводимости можно судить о расположении зоны проводимости

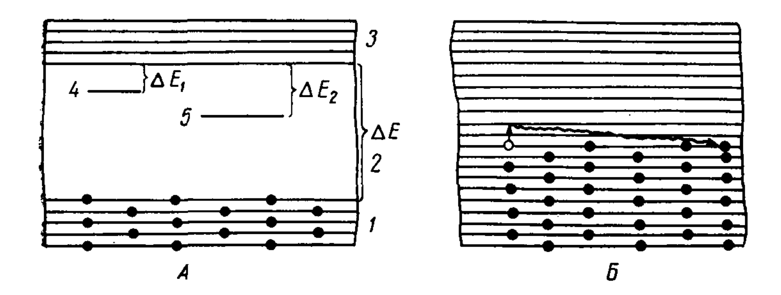


Рис. 106. Схема расположения энергетических уровней в полупроводнике (*А*) и проводнике (*Б*):

1 — валентная (заполненная) зона, *2* — запрещенная зона, *3* — зона проводимости (разрешенная, но не заполненная), *4* и *5* — локализированные примесные уровни, обусловленные различного рода дефектами кристалла, ΔE — энергетическая ширина запрещенной зоны; ΔE_1, ΔE_2 — энергетическое расстояние примесных уровней от нижней границы зоны проводимости, ● — электрон, ○ — электронная вакансия (дырка), горизонтальные линии — разрешенные для электронов энергетические уровни, волнистые стрелки — перемещение электрона в зоне проводимости

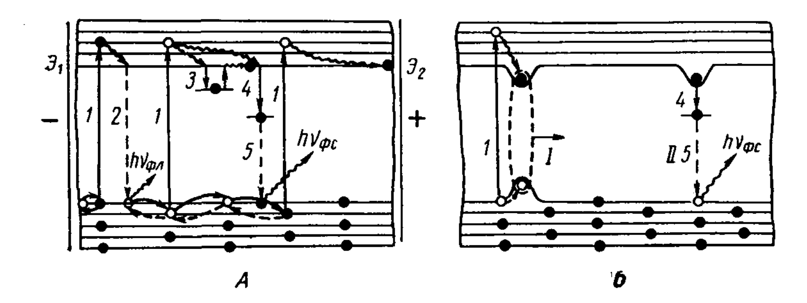


Рис. 107. Электронные процессы в полупроводниках, фотопроводимость: *А* — возбуждение и рекомбинация электронов; *Б* — возникновение экситона (I) и его разрушение на примесном уровне (II) с последующей рекомбинацией:

1 — переход электрона из валентной зоны (основное состояние) в зону проводимости под действием кванта света или термического возбуждения, *2* — межзонная рекомбинация, сопровождающаяся переходом выделенной энергии в излучение или тепло, *3* — безизлучательный переход на неглубокий примесный уровень (захват ловушкой) электрона с последующим возвращением его в зону проводимости, *4* — безизлучательный переход электрона на более глубокий примесный уровень с последующей рекомбинацией, *5* — рекомбинация с примесного уровня, сопровождающаяся сенсибилизированной люминесценцией; $h\nu_{фл}$ — флуоресценция, $h\nu_{фс}$ — фосфоресценция, $Э_1$, $Э_2$ — электроды, сплошные дугообразные стрелки — эстафетный обмен электронами в валентной зоне, пунктирные дугообразные стрелки — перемещение дырки в валентной зоне. Остальные обозначения те же, что и на рис. 106

по отношению к валентной зоне и глубине электронных ловушек. Существованием ловушек обусловливается и другое явление, наблюдаемое на фотопроводниках, — термолюминесценция. Термолюминесценция — это свечение, возникающее в том случае, если полупроводник при низкой температуре осветить, а затем (в темноте) нагреть. Под действием света электроны переходят в зону проводимости и попадают в ловушки; последующее нагревание способствует возвращению электронов в зону проводимости и обратному переходу на нижний уровень; этот процесс и сопровождается высвечиванием квантов. Электрон, находящийся в зоне проводимости или в электронной ловушке, обладает запасом энергии кванта, поглощенной в акте фотоионизации — разделении электрона и дырки. Предполагается, что эта энергия может быть использована при взаимодействии электрона или дырки с окружающими полупроводниковые структуры веществами; электрон может осуществлять восстановление какого-либо акцептора, а дырка — окисление доноров электрона. Таким образом, в полупроводнике может осуществляться как разделение первичного окислителя (дырка) и первичного восстановителя (электрон), так и «запасание» энергии в течение относительно длительного времени (в ловушках электронов).

В молекулярных кристаллах возникают условия для миграции энергии и заряда. Так пара электрон — дырка, возникшая при поглощении кванта, может в течение некоторого времени сохраняться и перемещаться как единое целое (экситон). Экситон (рис. 107), несущий с собой энергию возбуждения, вследствие быстрой миграции может «посетить» сотни и тысячи молекул прежде, чем его энергия будет растрачена в тепло или высвечена примесью (сенсибилизированная люминесценция примеси).

При захвате электрона ловушкой или под действием различных возмущений экситон распадается на электрон и дырку, после чего электроны могут самостоятельно перемещаться по структуре, обусловливая появление фотопроводимости. При миграции самого экситона фотопроводимости не наблюдается, так как положительный и отрицательный заряды взаимно компенсированы.

Миграция экситона и миграция электрона в кристаллических и квазикристаллических структурах может осуществляться на достаточно большие расстояния, объединяя в единую энергетическую систему многие сотни молекул и связывая центры поглощения с реакционными центрами, находящимися от них на значительном расстоянии. Многие свойства, приписываемые ранее полупроводникам, характерны и для таких систем, как замороженные водные растворы при низких температурах. Так, при освещении растворов ароматических соединений происходит фотоионизация, сопровождающаяся захватом электрона средой (сольватацией электрона), что энергетически эквивалентно его попаданию в «ловушку». Нагревание или освещение приводит к выходу

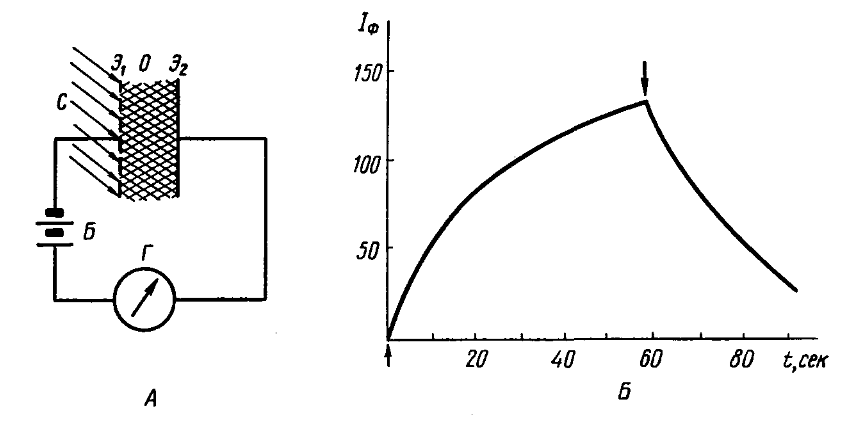


Рис. 108. Фотопроводимость белков:

А — схема измерения фотопроводимости: *С* — возбуждающий свет; $Э_1$ — полупрозрачный электрод, $Э_2$ — электрод, *О* — образец, *Б* — источник тока, *Г* — гальванометр, ↑↓ — включение и выключение возбуждающего света, $I_ф$ — фототок (в относит. ед.).

Б — кинетика изменения фототока во времени для пленки трипсина (по Владимирову)

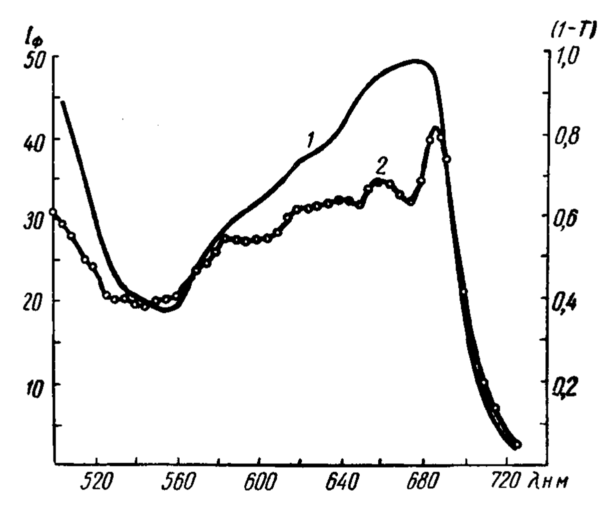


Рис. 109. Сопоставление спектра поглощения (*1*) и спектра фотопроводимости (*2*) пленки хлоропластов фасоли, $I_ф$ — фототок при выравненной (по числу квантов) интенсивности света (в относит. ед.)

электрона из ловушки и появлению фотопроводимости (рис. 108, 109). Последующая рекомбинация сопровождается люминесценцией, которая в зависимости от индуцирующего фактора называется «термолюминесценцией» или «индуцированной светом люминесценцией». Такое рекомбинационное свечение по спектру совпадает либо с флуоресценцией, либо с фосфоресценцией растворенного вещества.

Фотохимические реакции, спектры действия фотохимических реакций и фотобиологических процессов

В основе фотобиологического процесса лежит фотохимическая реакция (или реакции), в ходе которой энергия поглощенного кванта трансформируется в химическую энергию. Известно несколько типов фотохимических реакций, к наиболее важным из которых относятся фотоокисление, фотовосстановление, фотоизомеризация и фотодиссоциация. Механизм большинства фотохимических реакций еще не выяснен окончательно, имеющиеся о них сведения будут изложены при анализе конкретных процессов (см. ниже). В настоящем разделе рассматриваются общие закономерности, определяющие скорость фотопроцессов и их зависимость от спектрального состава действующего света.

Скорость необратимой фотохимической реакции (например, фотоинактивации), которую можно определить как изменение концентрации молекул, вовлекающихся в реакцию в единицу времени $\left(\frac{dc}{dt}\right)$, пропорциональна количеству молекул, возбуждающихся за то же время, так как именно возбужденные молекулы дают начало реакции. Отсюда следует, что скорость реакции должна быть пропорциональна числу квантов, поглощаемых в единицу времени $\left(\frac{dN}{dt}\right)$ (эту величину можно было бы назвать «скоростью поглощения квантов») $\frac{dc}{dt} \simeq \frac{dN}{dt}$. Поглощение, как известно, пропорционально количеству падающих на образец квантов (I) и концентрации поглощающих молекул:

$$\frac{dN}{dt} = s \cdot c \cdot I. \qquad (11.10)$$

Если рассматривать поглощение света образцом с площадью 1 $см^2$ и выражать концентрацию в количестве молекул на $см^3$, то коэффициент пропорциональности S будет иметь размерность площади $см^2$. Иначе говоря, он может рассматриваться как эффективное поперечное сечение поглощения молекулы, т. е. размер площади, попадание в которую приводит к поглощению кванта. Величина

этой площади, естественно, может отличаться от геометрической площади сечения молекулы. Уравнение полностью аналогично приведенному выше (см. раздел о поглощении света), отличается от него размерностями величин и коэффициентом. Сечение поглощения (S), как уже упоминалось, пропорционально молярному коэффициенту экстинкции ε и так же, как этот коэффициент, определяется поглощательной способностью молекул и зависит от длины волны света (можно показать, что $S = 3{,}8 \cdot 10^{-21}\, \varepsilon$ *см*^{2}).

Использование коэффициента S представляет ряд удобств для анализа реакций и расчетов, особенно в тех условиях, когда неизвестен молекулярный вес поглощающего вещества. Теперь можно перейти к уравнению для скорости фотореакции, для этого необходимо найти коэффициент пропорциональности между скоростью поглощения квантов и скоростью фотореакции. Этот коэффициент отражает тот факт, что не каждый поглощенный квант используется для фотореакции, так как часть квантов растрачивается в тепло или на люминесценцию. Коэффициент, показывающий, какая часть квантов из общего числа поглощенных квантов используется в фотохимической реакции, называется квантовым выходом фотохимической реакции (φ).

$$\varphi = \frac{\text{число прореагировавших молекул}}{\text{число поглощенных квантов}}\,.$$

Величина (φ) может быть определена экспериментально. При максимальной эффективности реакции квантовый выход равен единице (все поглощенные кванты идут на фотохимическую реакцию), однако обычно он не превышает нескольких десятков процентов или даже нескольких процентов, а часто имеет еще меньшую величину. Так, например, квантовый выход инактивации ферментов равен 10^{-3}—10^{-2}, т. е. в среднем необходимо поглощение молекулой не менее 100—1000 квантов, прежде чем она будет повреждена.

Формально можно представить, что фотохимическое действие осуществляется лишь в том случае, если квант не только поглощается, но при этом попадает в мишень, площадь которой еще меньше, чем поперечное сечение поглощения. Эта площадь может быть названа поперечным сечением фотореакции или фотопроцесса (σ). Соотношение величин s и σ определяется квантовым выходом $\left(\frac{\sigma}{s} = \varphi\right)$.

Выражение для скорости фотохимической реакции может быть получено если в уравнении (11.10) коэффициент s заменить коэффициентом σ:

$$\frac{dc}{dt} = -\sigma \cdot c \cdot i. \qquad (11.11)$$

Уравнение показывает, что скорость фотохимической реакции пропорциональна интенсивности падающего света (I — количество

квантов в единицу времени), концентрации поглощающих свет молекул (c) и сечению фотохимической реакции (σ).

Интегрируя уравнение для конечного отрезка времени (начиная от начала реакции при включении света, $t = 0$), можно

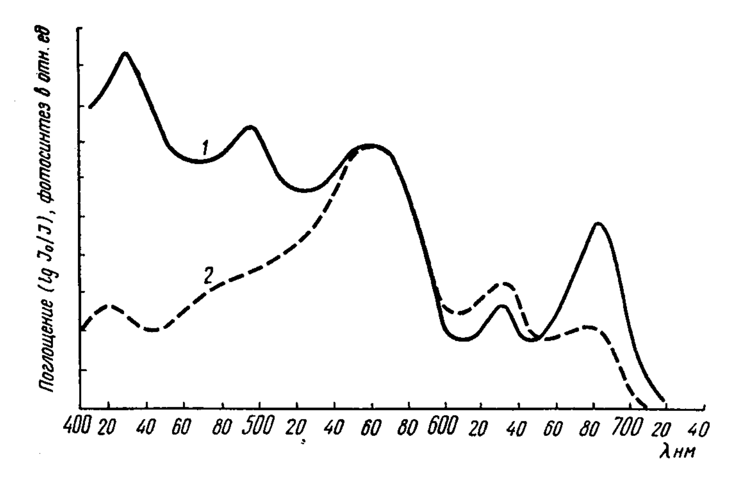


Рис. 110. Сопоставление спектра действия фотосинтеза со спектром поглощения пигментов у красной водоросли:

1 — поглощение, *2* — спектр действия фотосинтеза и спектр возбуждения флуоресценции; максимумы в спектре действия, соответствующие поглощению каротина (около 480 *нм*), фикоэритрина (540—560 *нм*) и фикоцианина (620—630 *нм*), указывает на миграцию энергии с этих пигментов на хлорофилл *a*. Понижение кривой спектра действия в области 680 *нм* связано с низкой активностью основной массы хлорофилла *a* (красное падение квантового выхода (по Дюйзенсу)

получить выражение, определяющее изменение концентрации реагирующих молекул во времени освещения:

$$\ln \frac{c}{c_0} = -\sigma \cdot I \cdot t; \quad c = c_0 e^{-\sigma I t}. \qquad (11.12)$$

Уравнения показывают, что при необратимой реакции концентрация молекул экспоненциально уменьшается в ходе облучения (увеличение концентрации продукта фотопревращения ($c_п$), соответственно описывается уравнением: $c_п = c_0 (1 - e^{-\sigma I t})$. Скорость фотореакции при непрерывном освещении уменьшается по мере уменьшения концентрации непрореагировавших молекул. Исследование кинетики фотохимических реакций проводят, измеряя концентрацию исходных молекул или фотопродуктов (например, по изменению поглощения или люминесценции в максимумах этих веществ). В том случае если кинетика реакции описывается приведенным выше уравнением, угол наклона прямой $\ln \frac{c}{c_0} = f(t)$ пропорционален поперечному сечению (σ) и интенсивности

света (I); σ можно определить, если измерена интенсивность падающего света. Величина квантового выхода может быть получена как отношение поперечного сечения фотореакции к поперечному сечению поглощения (определяемого спектрофотометрически).

Каким же образом скорость фотохимической реакции зависит от длины волны действующего света? Для экспериментального и теоретического решения этого вопроса рассматривают зависимость от длины волны относительной скорости реакции (т. е. скорость реакции при одинаковом количестве падающих квантов $\left(\frac{dc}{dt} \middle/ I_0\right)$. Указанная функция называется спектром действия фотохимической реакции, она аналогична спектру возбуждения люминесценции. В случае реакции, идущей при участии одного поглощающего свет вещества, квантовый выход ее не зависит от длины волны (см. стр. 331), поэтому спектральная зависимость целиком определяется вторым сомножителем — поперечным сечением поглощения σ. Следовательно, в этом случае спектр действия фотохимической реакции по форме должен совпадать со спектром поглощения вещества, ответственного за фотореакцию. Если же в фотохимическом процессе участвуют несколько веществ, то в спектре действия проявятся максимумы, характерные для поглощения этих веществ. Так, появление максимума в области 480—500 *нм* в спектре действия фотосинтеза указывает на участие в нем каротина, поглощающего в этой области, а максимум 650 *нм* связывается с вовлечением в фотосинтез хлорофилла *в* (рис. 110, 111). Исследования показали, что спектр действия фотоинактивации белка совпадает со спектром поглощения остатков ароматических аминокислот, что свидетельствует об участии этих остатков в фотохимических реакциях, ведущих к инактивации.

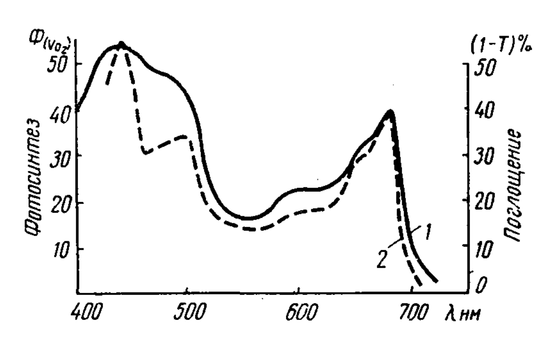


Рис. 111. Спектр действия фотосинтеза:
1 — спектр поглощения элодеи, 2 — спектр действия фотосинтеза, измеренный по скорости выделения кислорода (полярографически). Расхождение кривых в красной области ($\lambda > 680$ *нм*) указывает на красное падение квантового выхода; понижение относительной скорости фотосинтеза в области 480 *нм* связывается с меньшей эффективностью участия каротиноидов в фотосинтезе

Если установлено, что в фотореакции непосредственно участвует только одно вещество, поглощающее свет (A), то появление в спектре действия максимумов, характерных для других поглощающих веществ, находящихся в системе, свидетельствует о существовании миграции энергии с этих веществ на вещество A. Так,

например, присоединение группы СО к хромофорной части гемоглобина (гему) приводит к образованию комплекса (СО-гемоглобин), который распадается под действием света (последний процесс можно проследить по изменению спектра поглощения). При измерении спектра действия фотореакции было обнаружено, что наряду с максимумами (в видимой области спектра), принадлежащими хромофору, в нем проявляются максимумы в ультрафиолете, характерные для поглощения белковой части молекулы (глобина). Это позволило сделать вывод о миграции энергии с белка на хромофор, где она и используется в фотопроцессе. (При расчетах было учтено собственное поглощение гема в ультрафиолетовой области.)

Таким образом, исследование спектров действия позволяет выяснить, какие вещества ответственны за поглощение света, эффективного в фотопроцессе, оценить в ряде случаев долю их участия в фотохимических реакциях и исследовать миграцию энергии между поглощающими свет молекулами и молекулами, непосредственно участвующими в фотохимических реакциях.

При количественном изучении фотобиологических процессов в целом используются те же подходы, что и при исследовании фотохимических реакций, однако, естественно, что показатели протекания процесса, его эффективности более разнообразны. Помимо скорости процесса, выражающегося числом прореагировавших в единицу времени молекул (например, в случае измерения скорости выделения кислорода при фотосинтезе), могут быть использованы такие показатели, как процент проросших семян (по сравнению с темновым контролем), количество убитых ультрафиолетом бактерий, угол, на который изгибается стебель под действием света, и т. п. Спектр действия фотобиологического процесса представляет собой зависимость относительной величины эффекта $\left(\frac{Э}{I_0}\right)$ (на единицу падающей энергии в числе, пропорциональном количеству падающих квантов) от длины волны действующего света $\frac{Э}{I_0} = (1 - T)\cdot\varphi = f(\lambda)$, где φ — квантовый выход фотобиологического процесса.

Кривая спектра действия в случае одного поглощающего вещества совпадает со спектром поглощения этого вещества, ответственного за фотопроцесс. В случае участия нескольких веществ в поглощении света, эффективного для фотопроцесса, сопоставление спектров поглощения и спектров действия объекта позволяет оценить долю участия этих компонентов в появлении фотобиологического эффекта и миграцию энергии между ними (см. рис. 110 и 111).

Измерение спектров действия фотохимических реакций и фотобиологических процессов производится аналогично измерению спектров возбуждения люминесценции при последовательном

освещении объекта светом различных длин волн (через монохроматор или интерференционные светофильтры). Показатель скорости фотохимической реакции или величины фотобиологического эффекта делится на интенсивность падающего излучения при каждой длине волны (предварительно измеряется интенсивность, которая выражается в количестве квантов за единицу времени или числах, пропорциональных этой величине). Точное исследование спектров действия весьма не простая задача, и выбор соответствующих экспериментальных условий требует особого внимания. Необходимо работать с образцами, имеющими небольшую оптическую плотность, следить за равномерностью их освещения. В отличие от люминесценции, интенсивность которой пропорциональна интенсивности действующего света, величина эффекта фотопроцесса (эффект насыщения) обычно нелинейно зависит от интенсивности света (эффект нелинейности может проявляться как при малых, так и при больших интенсивностях).

Поэтому при изучении спектров действия предварительно исследуется характер зависимости фотопроцесса от интенсивности света при различных длинах волн (световые кривые). Обычно измерения спектров действия проводят при тех интенсивностях света, которые соответствуют линейному участку световой кривой.

Некоторые методы изучения механизма первичных стадий фотобиологических процессов

Абсорбционная и люминесцентная спектрофотометрия

Изучение пигментной системы и других поглощающих свет молекул связано с непрерывным усовершенствованием методов измерения поглощения и люминесценции и повышением их чувствительности и точности. Особую роль играет использование высокочувствительных приемников света — фотоумножителей и усилительных устройств. Для измерения спектров поглощения применяются монохроматоры с большой светосилой и разрабатываются чувствительные методы регистрации фототока (рис. 112).

Наряду с химическими, полярографическими и другими методами исследование поглощения и люминесценции часто используется для определения скорости появления или исчезновения вещества при фотобиологических процессах.

Максимумы поглощения и люминесценции становятся более резкими при понижении температуры, вместе с тем становится возможным измерение спектров лабильных промежуточных продуктов реакций, скорость которых сильно понижается при низкой температуре. Все это делает весьма перспективным исследование спектров поглощения и спектров люминесценции при низкой

температуре, например при температуре жидкого азота (—196° С). Для анализа очень слабых свечений применяются счетчики фотонов.

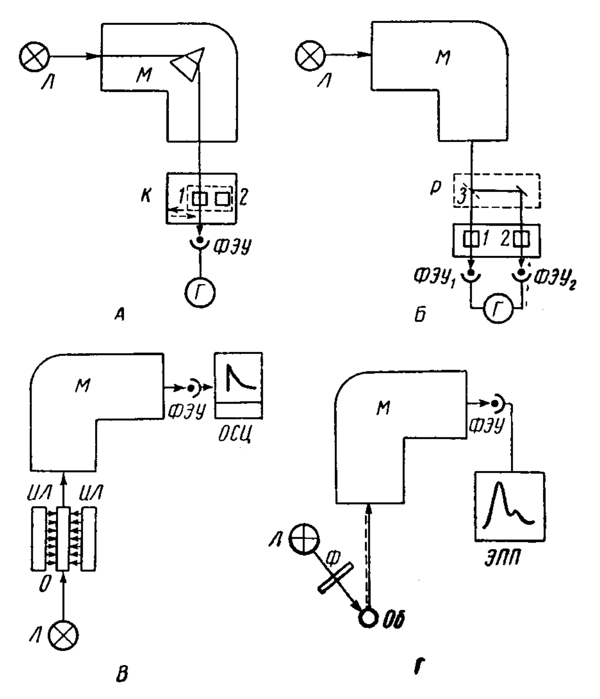


Рис. 112. Спектральные методы исследования: *А* — схема установки для измерения спектров поглощения; *Б* — для измерения дифференциальных спектров поглощения; *В* — для импульсной спектрофотометрии; *Г* — для измерения спектров люминесценции, *Л* — источник света, *М* — монохроматор, *К* — камера для объекта с перемещающейся кареткой, *1* — исследуемый объект, *2* — объект сравнения (в схеме *А* — кювета с растворителем, в схеме *Б* — при измерении дифференциальных спектров «свет минус темнота» — неосвещаемый объект), *ФЭУ* — фотоумножитель, $ФЭУ_1$ и $ФЭУ_2$ — фотоумножители, включенные «навстречу» друг другу, *Г* — прибор, измеряющий фототок, *ИЛ* — импульсные лампы, *Ф* — светофильтр, *ОСЦ* — осциллограф, *ЭПП* — самописец с усилителем

Дифференциальная спектроскопия. Если какой-либо пигмент (или поглощающее свет вещество), участвуя в фотобиологическом процессе, претерпевает изменения, например окисляется или восстанавливается, то эти изменения могут быть обнаружены по изме-

нению его поглощения. Так убыль исходного вещества вызовет уменьшение соответствующей ему области спектра поглощения. Об изменении концентрации можно судить по изменению оптической плотности в согласии с формулой (11.2). Однако если изменения невелики и быстро обратимы (довольно частый случай), то заметить изменения оптической плотности весьма трудно. Даже при непрерывном действии света только незначительная часть молекул будет находиться в измененном состоянии (иначе говоря, стационарная концентрация лабильного продукта будет очень низка). Для регистрации таких малых изменений поглощения и применяется метод дифференциальной спектроскопии. При этом производят непосредственное сопоставление двух совершенно одинаковых образцов, которые отличаются только тем, что один из них освещается дополнительным интенсивным светом («действующий свет»). Схема для измерения дифференциальных спектров приведена на рис. 112, *Б*. Луч, выходящий из монохроматора, расщепляется на два пучка равной интенсивности, которые затем проходят через сравниваемые объекты (если объекты несколько отличаются по оптической плотности, то интенсивность лучей изменяют так, чтобы выходящие пучки были точно выровнены перед измерением). Таким образом, до включения действующего света прибор покажет нулевое значение разности оптической плотности объектов. Если при включении действующего света в системе происходит изменение концентрации вещества (Δc), то оптическая плотность освещаемого образца также изменится:

$$\Delta D = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l. \qquad (11.14)$$

Если действие света приводит к увеличению поглощения, то знак ΔD будет положительным, если к уменьшению — отрицательным. Изменяя длину волны измеряемого монохроматического света, можно получить дифференциальный спектр («свет минус темнота») данного объекта. В отличие от обычного спектра поглощения этот спектр может иметь как положительные, так и отрицательные максимумы. Сравнивая дифференциальный спектр с обычными спектрами поглощения веществ, присутствующих в системе, иногда возможно установить, какие именно вещества претерпевают изменения, тогда как величина максимумов позволяет определить изменение их концентрации. Так, например, восстановление цитохромов в бактериальных клетках под действием света сопровождается увеличением поглощения в области поглощения восстановленной формы (ее спектр поглощения определяют заранее биохимическим путем, восстановив цитохромы). Если необходимо проследить кинетику процессов, то производят измерение величины дифференциального максимума во времени.

Современные спектральные установки, специально разработанные для измерений дифференциальных спектров поглощения (дифференциальные спектрофотометры), позволяют определять

ничтожные изменения оптической плотности (до 10^{-5}), что соответствует 0,001%.

Дифференциальный метод может быть применен не только для измерения поглощения, но и для исследования флуоресценции, так, например, исследуя изменения люминесценции пиридиннуклеотидов (НАДФ), светящихся в синей области спектра под действием красного света, поглощаемого хлорофиллом, судят о кинетике фотосенсибилизированного восстановления НАДФ.

Импульсная спектрофотометрия. Под действием мощных вспышек света значительная часть поглощающего вещества может быть переведена на короткое время в измененное состояние (триплетное или радикальное состояние, лабильную фотовосстановленную или фотоокисленную форму). Однако чтобы «застать» молекулу в измененном состоянии, необходимо произвести очень быстрое измерение спектра поглощения. В последнее время разработан ряд методов так называемой импульсной спектрофотометрии (флеш-фотолиз). Для регистрации изменений поглощения используют обычно вторую (более слабую) вспышку света, которая следует непосредственно за мощной вспышкой «действующего света». В некоторых установках используют измеряющий свет постоянной интенсивности и тогда на регистрирующем осциллографе, соединенном с фотоумножителем, остается след, вызванный быстрым изменением поглощения (горизонтальная прямая линия резко изламывается в момент включения вспышки действующего света). По форме получающейся кривой можно рассчитать скорость фотопроцесса и последующих темновых реакций. Современные импульсные лампы, применяемые в таких установках, могут давать вспышки мощностью до 10^2 *дж* и длящиеся всего 10^{-9}—10^{-4} *сек*. Под действием такой вспышки более 80% пигмента в растворе может быть переведено в триплетное или радикальное состояние, что дает возможность измерить спектр измененных молекул и установить последовательность их взаимопревращений (например, триплетное состояние → радикал, ион-радикал → первичная фотовосстановленная форма). Схема установки для импульсной спектрофотометрии дана на рис. 112, *В*.

ФОТОСИНТЕЗ

Общие черты процесса

Фотосинтез — один из самых значительных фотобиологических процессов, постоянно и в огромных масштабах совершающийся на нашей планете. Этот процесс лежит в основе всех других биологических процессов, обеспечивая их энергией и строительным материалом. О масштабах фотосинтеза можно составить представление, если принять во внимание, что количество энергии,

ежегодно накапливаемой фотосинтезирующими организмами океана и суши, во много раз больше той энергии, которая имеется в распоряжении человечества. Естественно поэтому, что познание энергетики фотосинтеза и его механизма в недалеком будущем может сыграть решающую роль в разрешении проблемы обеспечения человечества энергией, сырьем для производства и пищей [1].

Общая схема фотосинтеза. Как известно, основная реакция фотосинтеза растений — это фотохимическая реакция синтеза органического вещества из простых веществ — углекислоты и воды. Энергия, необходимая для реакции, — это энергия света, поглощаемого хлорофиллом или другим пигментом, который может рассматриваться как фотокатализатор реакции:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow[\text{Хл}]{h\nu} C(HOH) + O_2$$

Конечными продуктами фотосинтеза могут быть самые разнообразные вещества (аминокислоты, белки, жиры и т. д.). Однако можно считать, что синтез продуктов на уровне углевода достаточен для обеспечения синтеза других веществ обычным биохимическим путем. Поэтому часто химический продукт реакции обозначают символом C(HOH) — углевод типа глюкозы ($C_6H_{12}O_6$). Существенным отличием фотосинтеза от других биологических реакций синтеза, идущих в темноте (например, синтез белка в клетках животных), является тот факт, что только при фотосинтезе сложные вещества возникают непосредственно из таких простых веществ, как вода и углекислый газ. Во всех темновых процессах синтез одних веществ сопряжен с распадом других. Последний процесс и служит источником энергии для синтеза. В случае фотосинтеза источником энергии является свет.

Основные ступени фотосинтеза. Для того чтобы рассмотреть механизм первичных стадий фотосинтеза, необходимо бросить общий взгляд на схему процесса в целом и определить границу первичных процессов и последующих реакций. Схематически такое разделение приведено на рис. 113.

Как видно из схемы, начальный этап фотосинтеза — это поглощение кванта света пигментом и ряд реакций (фотохимических и ферментативных), которые в конце концов обеспечивают выделение кислорода из воды и образование двух веществ — восстановленного НАДФ и АТФ. Для последующих процессов свет уже не является необходимым, они могут протекать и в темноте. Энергия, запасенная в АТФ и НАДФ, используется для биохимических превращений углерода, входящих в цикл Калвина. Последо-

---

[1] Здесь не рассматривается фотосинтез бактерий, использующих другой донор электронов, чем вода, который можно описать уравнением:

$$CO_2 + HA \rightarrow CHOH + A$$

вательность темновых реакций превращения соединений углерода была исследована с помощью метода меченых атомов. Различные ответвления от этого цикла приводят к образованию более сложных соединений и в, частности, полисахаридов аминокислот, белков, жиров и т. д.

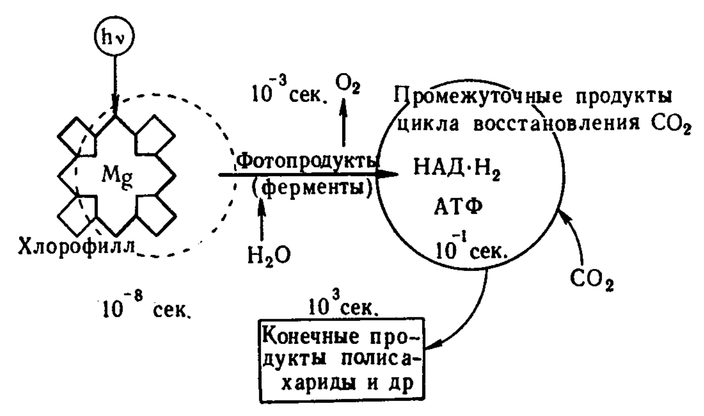


Рис. 113. Общая схема фотосинтеза (по Красновскому). Цифры указывают длительность жизни промежуточных продуктов.

Объяснение см. в тексте

Первичный продукт фотохимических реакций. Если фотосинтез является процессом превращения энергии света в энергию химической связи, то можно считать, что специфические реакции фотосинтеза кончаются на той стадии, когда создан первый химически устойчивый продукт, содержащий запас свободной энергии и способный к самостоятельному завершению остальных темновых реакций. Этот продукт (или продукты) определит границу между первичными процессами и последующими темновыми реакциями. Вместе с тем проблема первичных стадий сводится к проблеме образования первичных продуктов в ходе фотохимической реакции.

Выше указывалось, что в качестве таких стабильных веществ, необходимых для функционирования цикла Калвина, можно рассматривать восстановленный НАДФ и АТФ, однако в последнее время выяснено, что им предшествуют другие вещества. Так установлено, что предшественником восстановленного НАДФ является железосодержащий белок — ферредоксин. Весьма вероятно, что существуют еще более ранние и менее устойчивые продукты фотореакций, в которых запасена энергия квантов (возможно, в частности, фотовосстановленные или фотоокисленные пигменты или вещества, непосредственно реагирующие с ними).

Фоторецепторы фотосинтеза. Несмотря на многочисленные попытки, до настоящего времени не удается воспроизвести фото-

синтез в искусственных условиях. Причиной неудач, естественно, следует считать недостаточность наших знаний о том, как протекает этот сложный процесс в целой живой клетке. Сложность его заключается в том, что он осуществляется, если можно так выразиться, в нескольких измерениях:

1. Существует строгая последовательность многих реакций во времени; выпадение или даже замедление одной из них приводит к уменьшению эффективности или прекращению фотосинтеза.

2. Процессы фотосинтеза тесно сопряжены пространственно. Продукты одних реакций должны «подхватываться» последующими реакциями, в которых они служат исходным веществом. Разобщение реакций в пространстве ведет к потере эффективности фотосинтеза.

3. Фотосинтез — это направленный процесс, идущий с увеличением свободной энергии, и поэтому имеющий тенденцию к обратному движению (о чем, в частности, свидетельствует высвечивание квантов так называемой «фотосинтетической люминесценции»). Поэтому в фотосинтезе должны существовать механизмы разделения продуктов реакций, которые уменьшают скорость обратных реакций и вследствие этого повышают эффективность прямого процесса.

Для осуществления эффективного фотосинтеза необходимо наличие специального аппарата, который обеспечил бы указанное пространственно-временное сопряжение отдельных процессов и их автоматическое регулирование. Таким аппаратом служит выработанная в течение длительной эволюции структура фоторецепторов фотосинтеза — хлоропластов и гранул.

Основной фотосинтетический пигмент — хлорофилл *a*. В растительной клетке имеется большое разнообразие пигментов, однако хлорофилл или его аналоги существуют во всех фотосинтетически активных организмах. Имеется ряд убедительных доказательств того, что он является необходимым участником фотосинтеза, тогда как другие пигменты в какой-то мере взаимозаменяемы. Формула хлорофилла приведена на стр. 325. Молекула этого пигмента (являющаяся производным порфина) состоит из системы 4 пиррольных колец с несколькими заместителями (порфинное ядро) и длинного «хвоста», представляющего собой многоатомный спирт — фитол, который «прикреплен» к одному из колец. Сбоку от ядра имеется еще одна циклическая группа, так называемое циклопентановое кольцо (рис. 114).

Наиболее замечательным и важным свойством молекулы хлорофилла следует, пожалуй, считать наличие сопряженных двойных связей. Такая система связей приводит к появлению общего электронного облака, принадлежащего хромофору в целом и образованного π-электронами (делокализованные электроны). Именно этим свойством определяется способность к поглощению квантов света определенной величины и запасанию энергии внутри молеку-

лы. Коньюгированная система (хромофор) создает возможность передачи энергии возбуждения к другой аналогичной молекуле, если их плоские циклические кольца располагаются на небольшом расстоянии друг от друга. Не менее существенна, по-видимому, роль коньюгированной системы и в определении фотохимических свойств молекулы — способности воспринимать или отдавать электрон. Эксперименты показали, что этот окислительно-восстановительный акт совершается с участием не отдельных атомов, а всей коньюгированной системы пигмента. (Весьма вероятно, что циклопентаноновое кольцо также может принимать участие в фотохимических реакциях.)

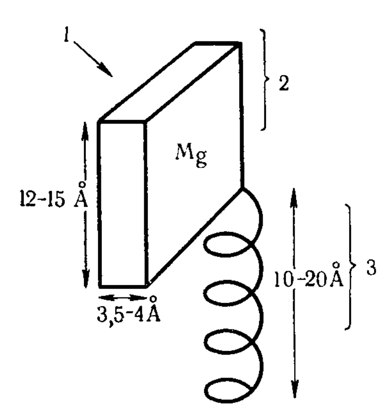
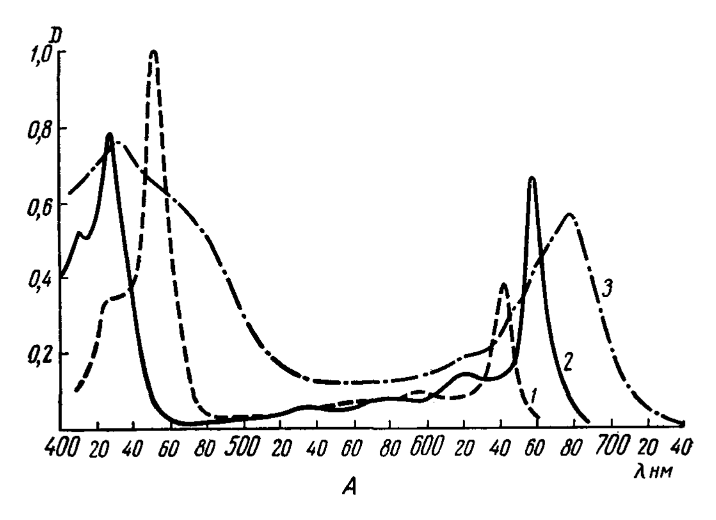


Рис. 114. Пространственная модель молекулы хлорофилла:
1 — хромофор-ароматическое ядро, 2 — гидрофильная часть, 3 — липофильная часть (фитол)

В бактериальных клетках роль хлорофилла *a* выполняют бактериохлорофилл (у пурпурных бактерий) и бактериовиридин (у зеленых).

Хлорофилл *b* является близким аналогом хлорофилла *a* и в несколько меньшем количестве присутствует в фотосинтезирующих клетках высших растений и водорослей. Максимумы спектра поглощения этого пигмента несколько сближены между собой по сравнению с хлорофиллом *a*. Таким образом, поглощение этого пигмента как бы несколько заполняет провал в поглощении хлорофилла *a*. Люминесценция хлорофилла *b* лежит в более коротковолновой области, чем у хлорофилла *a* (на 25—30 *нм*). Хлорофилл *b* и ряд пигментов с иной, чем у порфиринов, структурой молекулы (каротин, фикобилины и др.) относятся к так называемым «сопровождающим пигментам», которые выполняют, по-видимому, отличные от хлорофилла *a* функции в фотосинтезе (см. рис. 102, *А* и *Б*).

В последние десятилетия установлено, что фотосинтетические пигменты могут находиться в клетке в нескольких модификациях, отличающихся состоянием пигмента (при сохранении неизменной химической структуры молекулы). Такие модификации обычно называются формами пигмента, иногда «нативными формами» пигмента. Существование нескольких форм пигментов в растении было показано Красновским и сотрудниками. В последнее время стало ясным, что различные формы хлорофилла отличаются не только по своим спектральным свойствам, но и по своей функции при фотосинтезе. Наиболее простым критерием для определения нативной формы пигмента являются ее спектральные свойства. Так, если при измерении спектра поглощения и люминесценции живых клеток обнаруживается не один, а несколько максимумов



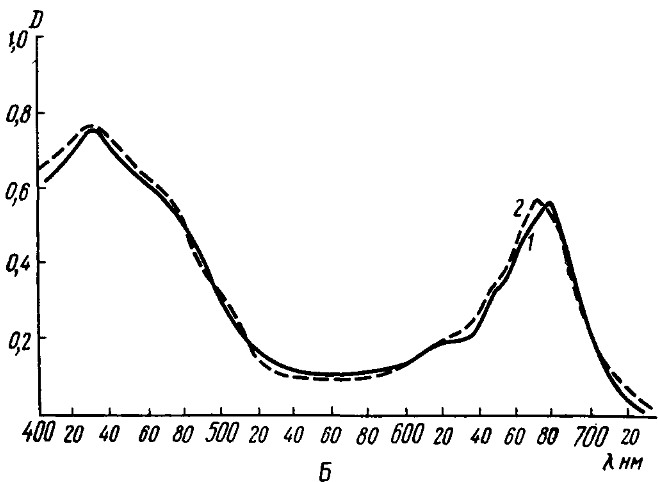


Рис. 115. *А* — сопоставление спектров поглощения пигментов в разбавленном растворе и в клетке:

1 — хлорофилл *b* в разбавленном растворе (эфир), *2* — хлорофилл *a* в разбавленном растворе (эфир), *3* — лист элодеи (хлорофилл *a* + хлорофилл *b* + каротиноиды). Видно значительное отличие спектров хлорофиллов в растворе и в клетке, проявляющееся в смещении максимумов поглощения хлорофиллов в клетке в длинноволновую сторону («красное смещение»)

Б — сопоставление спектров поглощения пигментов в клетке и в модельной системе:

1 — лист элодеи (высшее растение), *2* — пленка, полученная из смеси чистых пигментов (хлорофилл *a* + хлорофилл *b* + β-каротин в соотношении 6:3:1). Видно близкое сходство спектров агрегированных пигментов в модельной системе и в клетке

поглощения в красной области спектра, в то время как при экстрагировании пигмента в раствор нельзя обнаружить никаких максимумов, кроме обычного максимума хлорофилла, то есть основания предполагать, что в клетке находится несколько форм хлорофилла. Формы пигментов обозначают цифрой, которая указывает положение ее максимума поглощения в клетке. Так, в спектрах ряда водорослей обнаруживаются максимумы поглощения при 670, 685, 690 *ммк*, соответственно говорят о формах хлорофилла *Хл а* 670, *Хл а* 685 и *Хл а* 690. Их можно различать и по максимумам в спектре люминесценции. Существенно, что максимумы нативных форм исчезают не только при экстрагировании пигмента, заменяясь максимумами, характерными для растворов пигмента, но и при других воздействиях, например при нагревании листьев до 90—100° в течение нескольких минут, хотя при этом также не происходит сколь-нибудь заметного разрушения химической структуры молекул пигмента. Поэтому для исследования нативных форм необходимо производить измерения на целых клетках с применением описанных выше методов (производная спектроскопия, низкотемпературные спектры поглощения и люминесценции и т. п.). Некоторые из форм удалось наблюдать и на гомогенатах клеток и хлоропластах.

Какова же причина различий нативных форм пигмента? Как уже говорилось выше, она заключена в том специфическом влиянии, которое оказывает на молекулу пигмента внутреннее молекулярное окружение. Можно отличать несколько основных типов такого взаимодействия:

1. Пигмент-пигментное взаимодействие. Наиболее частый случай, когда взаимодействуют между собой молекулы одного и того же пигмента (например, хлорофилла *а*). Этот тип влияния наиболее существен при высокой концентрации данного пигмента в клетке, когда расстояния между его молекулами минимальны. Менее изучено взаимовлияние различных молекул (например, каротина и хлорофилла). Пигмент-пигментное взаимодействие — наиболее сильный тип взаимодействия, поэтому им могут быть объяснены особенно значительные спектральные различия нативной формы и пигмента в растворе, в частности большое смещение спектра в длинноволновую область в живых организмах (рис. 115, 116).

2. Влияние, оказываемое на пигмент молекулами других веществ, например молекулой белка, с которой пигменты образуют комплекс.

3. Влияние «внутреннего растворителя», т. е. той среды, в которой могут быть растворены молекулы пигмента (например, липоидные вещества, водная фаза и т. д.). Роль пигмент-пигментного взаимодействия подтверждается опытами по исследованию спектров модельных систем с изолированными агрегированными пигментами.

Если сравнить спектры поглощения описанных модельных систем со спектрами хлорофилла в живой клетке, то большое сходство между ними становится несомненным. Сравнительное иссле-

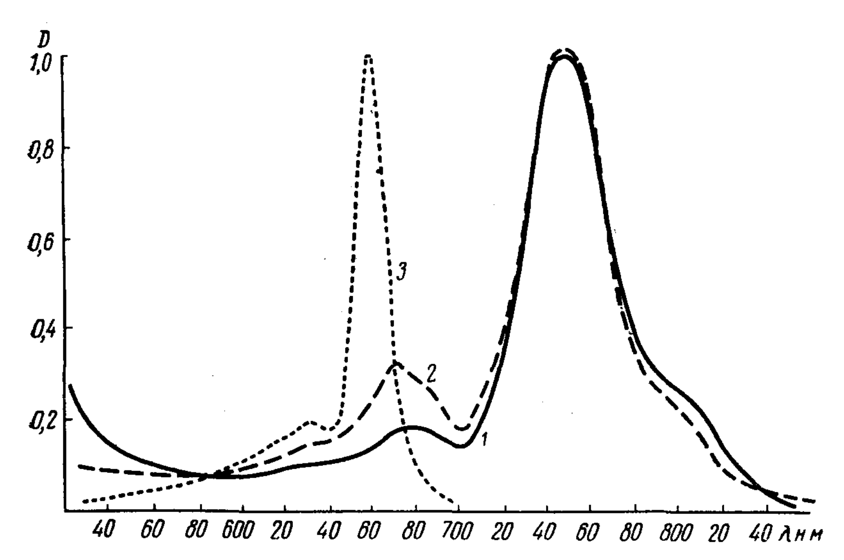


Рис. 116. Сопоставление спектров поглощения зеленых серных бактерий (*1*), пленки бактериовиридина (*2*) и разбавленного раствора бактериовиридина в серном эфире (*3*). Видно резкое различие спектра раствора и клеток и сходство спектров пленки и клеток

дование спектральных свойств хлорофилла в клетке и в модельной системе делает довольно обоснованным вывод о том, что нативные формы хлорофилла и других пигментов из класса порфиринов,

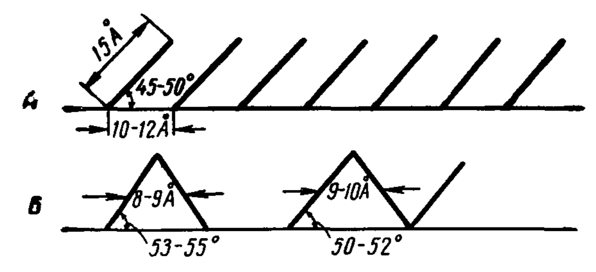


Рис. 117. Образование агрегатов хлорофилла *a*: расположение хромофоров в монослое пигмента (*А*) и при образовании димеров и полимеров пигментов (*Б*)

а также каротиноидов — это агрегированные формы, аналогичные тем, которые возникают в монослоях и пленках и концентрированных растворах пигментов (рис. 117).

Механизм фотосинтеза

Энергетика фотосинтеза. Для анализа фотосинтеза необходимо обратить внимание на то, что в основной реакции (см. стр. 351) происходит разрыв сильной связи между кислородом и водородом (в воде) и возникновение более слабых связей (водород — углерод в углеводородном соединении и кислород — кислород в молекуле кислорода). Таким образом, реакция идет с увеличением свободной энергии, которая приносит с собой квант света. Количественно общая величина запасенной энергии может быть определена по выделению тепла при обратном процессе — сжигании продукта реакции углевода. Эта величина равна 112 *ккал/моль* кислорода или на 1 *моль* «элементарных единиц углевода»— CH_2O (т. е. 672 *ккал/моль* углевода). Увеличение свободной энергии оказывается еще большим — около 120 *кал/моль* (так как реакция идет с уменьшением энтропии). Таким образом, фотосинтез можно рассматривать как «запасание» энергии квантов в химических продуктах реакции (O_2 и CHOH).

Теоретически для обеспечения этого процесса необходимо поглощение не менее трех квантов красного света (энергия кванта 680 *нм* равна 42 *ккал/моль*).

Важно подчеркнуть, что для высвобождения и использования этой энергии необходимо обратное соединение продуктов реакции ($CH_2O + O_2 = CO_2 + H_2O$), т. е. окисление углеводов, которое может осуществляться либо медленно — в биохимических реакциях окисления, идущих в клетках растений и животных, либо быстро — при сжигании растительного материала. Таким образом, фотосинтез служит источником свободной энергии и тепла.

Необходимо указать на значение второго продукта реакции — кислорода, без которого невозможно использование запасенной при фотосинтезе энергии.

Фотосинтез — как электронный процесс. В ходе основной реакции фотосинтеза осуществляется перенос атомов водорода от воды к углекислоте с образованием углевода. Иначе говоря, ее можно рассматривать как восстановление углекислоты, сопряженное с окислением воды.

Перенос атома водорода ($H = H^+ + e^-$) можно рассматривать как ступенчатый процесс с первоначальным перемещением электрона (e^-), а затем протона (H^+). Именно перенос электрона требует затраты энергии; в клеточной среде имеется достаточное количество протонов, которые могут доставляться к любому реакционному центру.

Таким образом, для упрощения имеет смысл рассматривать фотосинтез как окислительно-восстановительный процесс, связанный с переходом электронов от воды, в конце концов, к сложным органическим соединениям. При этом из более устойчивого

соединения (с меньшей энергией) электрон переходит в более неустойчивое (с большей энергией) соединение. Таким образом, происходит «подъем» электрона на более высокий энергетический уровень за счет поглощенного кванта излучения. При этом осуществляется разложение воды на радикалы OH и атомы водорода (радикалы OH реагируют между собой, давая молекулу O_2).

Для того чтобы оценить величину энергии, необходимой для такого подъема электрона, необходимо знать разницу в окислительно-восстановительных потенциалах систем, между которыми происходит перенос электрона. Суммарная окислительно-восстановительная реакция фотосинтеза $H_2O + CO_2 \rightarrow CH_2O,\ O_2$ может быть рассмотрена как сопряжение двух окислительно восстановительных пар:

$$2H_2O \longrightarrow O_2 + 4\bar{e} + 4H^+ \qquad (1)$$

$$\frac{\overset{+}{C}O_2 \longrightarrow CH_2O - 4\bar{e} - 4H^+}{CO_2 + H_2O \longrightarrow CH_2O + O_2} \qquad (2)$$

для первой из них потенциал Eh положителен (+0,8 *в*), для второй — отрицателен (—0,4 *в*).

Перенос электронов от воды к CO_2 связан, таким образом, с перепадом окислительно-восстановительного потенциала 1, 2 *в*.

$$\begin{array}{lclcl} CO_2 & \longrightarrow & X & \longrightarrow & CH_2O \qquad -0{,}4 \\ & & | & & \qquad\qquad 0 \\ H_2O & \longrightarrow & ZH & \longrightarrow & O_2 \qquad +0{,}8 \end{array}$$

Это значит, что на «поднятие» каждого электрона затрачивается энергия, равная 1,2 *эв*. Поскольку для восстановления одной группы CH_2O (или выделения O_2) требуется 4 электрона, то этот процесс должен обеспечиваться энергией в $1{,}2 \cdot 4 = 4{,}8$ *эв* или 112 *ккал/моль*.

Итак, для осуществления элементарного окислительно-восстановительного акта, лежащего в основе фотосинтеза, необходим механизм переноса электронов против «темнового» термодинамического равновесия, приводимый в движение солнечным светом. Следует сразу оговориться, что приведенные выше реакции являются суммарными и не описывают конкретных реальных стадий процесса.

Между начальным донором электронов (вода) и конечным их акцептором (CO_2) должно находиться некоторое (неизвестное) количество промежуточных доноров (ZH) и акцепторов (X) электрона (водорода). Снабжение реакции световой энергией не может совершаться за счет прямого поглощения указанными реагирующими между собой веществами (они не окрашены и не поглощают света в видимой области спектра, эффективной для фотосинтеза). Поэтому в реакции должны участвовать окрашенные вещества — пигменты — сенсибилизаторы, поглощающие свет и направляю-

щие энергию для использования в системе окислительно-восстановительных реакций.

Таким образом, основной процесс фотосинтеза должен слагаться из следующих реакций: 1) удаления электрона (водорода) от воды; 2) перенос его «вверх», сопряженный с поглощением света пигментом и восстановлением промежуточного акцептора; 3) восстановление CO_2, идущее с участием этого акцептора и приводящее к образованию конечных продуктов фотосинтеза.

Упоминавшиеся выше реакции относятся к окислительно-восстановительной стороне фотосинтеза, которая связана с возникновением основного восстановленного продукта реакции НАДФ и запасанием основного количества энергии. Исследования последних лет показали, однако, что осуществление реакции синтеза связано с утилизацией дополнительной энергии, заключенной в АТФ, причем это богатое энергией соединение также образуется из АДФ в ходе световой стадии фотосинтеза (фотосинтетическое фосфорилирование). Анализ этих реакций фотофосфорилирования является теперь одной из главных сторон проблемы механизма фотосинтеза.

Таким образом, проблема фотохимического механизма фотосинтеза сводится к проблеме о том, каким путем поднимается электрон с низшего на более высокий энергетический уровень, какие вещества (и в какой последовательности) служат промежуточными донорами и акцепторами электрона, как сопрягается чисто физический акт возбуждения пигмента с химическими реакциями, т. е., короче говоря, каким образом происходит запасание энергии квантов в первичных продуктах фотосинтеза. Имеется два основных подхода к решению этой задачи. Один из них основан на чисто физических представлениях, согласно которым хлоропласт или его часть может быть представлен как полупроводник, и запасание энергии рассматривается как чисто электронный процесс.

Однако большинство накопленных экспериментальных фактов более удовлетворительно могут быть объяснены, исходя из более традиционных биохимических или фотохимических представлений. При этом первичный процесс фотосинтеза рассматривается как последовательность реакций, в ходе которых определенные вещества взаимодействуют между собой как доноры и акцепторы электрона и водорода (т. е. вступают в окислительно-восстановительные взаимодействия).

Участие пигментов-сенсибилизаторов в механизме фотосинтеза. О том, какие пигменты участвуют в поглощении энергии, утилизируемой при фотосинтезе, говорит спектр действия фотосинтеза.

Наиболее распространенным методом исследования служит измерение относительной скорости выделения кислорода (по отно-

шению к одному и тому же числу падающих квантов — $\frac{v_{O_2}}{I_0}$) с помощью чувствительных полярографов. Наиболее удобны устройства, в которых непосредственно регистрируется скорость изменения концентрации кислорода у электрода с расположенным на нем объектом (суспензия клеток, лист растений). Сопоставление таких спектров действия со спектрами поглощения тех же объектов показывает, что в эффективном для фотосинтеза поглощении участвует как хлорофилл *a*, так и «дополнительные», сопровождающие пигменты (хлорофилл *b* и каротиноиды в высших растениях и зеленых водорослях, фикобилины — фикоэритрин и фицоцианин в бурых водорослях). При этом эффективность участия некоторых сопровождающих пигментов, например хлорофилла *b*, фикобилинов, может быть очень высокой (такой же или даже выше, чем у основной массы хлорофилла *a*), тогда как других (каротиноиды) несколько ниже, чем у хлорофилла *a*: кривая спектра действия в области поглощения каротиноидов проходит ниже кривой спектра поглощения (см. рис. 110).

Особый интерес представляют результаты исследования спектров действия в красной области, где должен поглощать только сам хлорофилл *a*. Работами Эмерсона и других исследователей было обнаружено, что в области за главным максимумом ($\lambda >$ $>$ 680 *нм*) поглощения хлорофилла *a* эффективность возбуждения фотосинтеза сильно падает — кривая спектра действия быстрее спадает вниз, чем кривая спектра поглощения (см. рис. 110 и 111). Это явление, получившее название «красного падения» квантового выхода, указывает на то, что в этой области поглощают какие-либо пигменты (или пигмент), участвующие в фотосинтезе с меньшим квантовым выходом, чем основная масса хлорофилла *a*. Такими центрами служат, по-видимому, длинноволновые формы самого хлорофилла *a*: *Хл a* 685, *Хл a* 690.

Ряд фактов указывает на то, что непосредственно в фотохимические реакции фотосинтеза включаются далеко не все пигменты, участвующие в процессе эффективного для фотосинтеза поглощения света. Существует, по-видимому, ограниченное число фотохимических пигментных центров, которые снабжаются энергией всеми остальными поглощающими пигментами. Действительно, исследования показывают, что бактерии и растения, лишенные почти нацело некоторых сопровождающих пигментов, сохраняют способность к активному фотосинтезу. В ряде опытов удаляли даже основную массу хлорофилла *a* или его бактериального аналога, и тем не менее оказывалось возможным наблюдать обратимые изменения поглощения и другие эффекты, связанные с первичными фотохимическими реакциями. Если считать доказанным, что непосредственно в фотосинтезе участвуют только один или два пигментных центра, то, исходя из формы спектров действия, в которых отчетливо проявляются максимумы остальных пигментов,

ясно, что эти последние должны каким-то образом передавать поглощенную энергию на активные центры. В принципе возможно несколько путей такой передачи, однако экспериментально более доказана и изучена резонансная миграция энергии и миграция экситона. Такой перенос осуществляется всегда с коротковолновых на более длинноволновые пигменты и отчетливо проявляется при изучении сенсибилизированной люминесценции (см. стр. 110 и 111).

Так, например, высшие растения обычно содержат значительное количество хлорофилла *b* (около 1/3) с максимумом поглощения около 650 *нм*. В то же время в спектре люминесценции листьев проявляются только максимумы, соответствующие излучению хлорофилла *a*. Можно было бы отсюда предположить, что хлорофилл *b* просто не люминесцирует в клетке, однако в спектре возбуждения люминесценции обнаруживается интенсивный максимум, соответствующий поглощению хлорофилла *b* (650 *нм*). Это явление можно наблюдать как при комнатной, так и при очень низкой температуре (—196°). Тушение собственной люминесценции хлорофилла *b* и появление его максимума в спектре возбуждения свидетельствуют о миграции энергии с хлорофилла *b* на хлорофилл *a*, эффективность которой очень высока (до 100%).

Очень наглядно проявляется эффект миграции энергии с фикобилиновых пигментов на хлорофилл *a* в бурых водорослях, где прослеживается миграция энергии с более коротковолнового фикоцианина на фикоэритрин и затем на хлорофилл *a* (см. рис. 110). Установлен также факт существования миграции энергии между каротином и хлорофиллом *a*.

Поскольку условия резонансной миграции могут выполняться для целого ряда пигментов (каротин, фикобилины, хлорофилл), а направление ее соответствует передаче от более коротковолнового к более длинноволновому пигменту, то создаются условия своеобразного «стока» энергии с целой группы пигментов на самые длинноволновые пигменты (формы хлорофилла *a*). Если эти формы служат фотохимическими центрами, то они таким образом снабжаются энергией многих поглощающих свет молекул других пигментов.

Миграция энергии существует не только между разнородными молекулами разных пигментов, но и между молекулами одного и того же пигмента. О миграции энергии между молекулами хлорофилла *a* свидетельствует деполяризация его люминесценции в живой клетке. Обнаружена миграция энергии и между различными формами хлорофилла *a* (с коротковолновых на длинноволновые).

Механизм миграции энергии со «стоком» на длинноволновые пигменты, играющие роль фотохимических центров, может иметь существенное значение для повышения эффективности работы этих центров. Действительно, время «срабатывания» центра в фотохи-

мической реакции может быть весьма небольшим (доли секунды и меньше), тогда как даже на ярком солнечном свету плотность потока квантов так мала (по сравнению с площадью эффективного поглощения молекулы), что акты поглощения следуют лишь через десятки минут.

Таким образом, если бы каждый центр должен был сам себя обеспечивать энергией, то он «простаивал» бы значительную часть времени. Если же фотохимический центр соединен с несколькими сотнями молекул других пигментов (таковыми могут быть и сопровождающие пигменты и фотохимические реактивные молекулы того же хлорофилла *а*), то при попадании кванта в любую из этих молекул (вероятность такого события в сотни раз выше, чем попадания в реакционный центр) приводит к быстрой миграции энергии.

Это перемещение энергии, вообще говоря, хаотично, но оно происходит очень быстро и только с более коротковолновых на более длинноволновые молекулы, поэтому в конце концов она оказывается на молекуле пигмента с самым низким энергетическим уровнем, находящейся в фотохимическом центре, которая служит ловушкой всей поглощенной энергии. Такая система энергетически взаимодействующих молекул пигмента получила название «фотосинтетической единицы». Эффективная миграция может происходить при достаточном сближении молекул, поэтому предполагают, что в основе фотосинтетической единицы лежит и специальная структурная организация — молекулы пигмента расположены на поверхности общего белкового носителя (диаметр глобулы, на которой могут разместиться несколько сотен молекул, должен составлять 100—250 Å, т. е. приближается к размерам макромолекулы белка). Действительно, подобного рода структуры как будто бы можно видеть на электронных микрофотографиях хлоропласта при большом разрешении.

Таким образом, существуют два основных пути участия пигментов в фотосинтезе: 1) прямое участие молекул, являющихся фотосинтетическим центром в фотохимических реакциях (за счет собственного поглощения или главным образом за счет миграции энергии с других молекул); 2) поглощение света и передача энергии на фотохимические центры. Молекулы, служащие фотохимическими центрами, представлены в основном некоторыми особыми формами хлорофилла *а* (по-видимому, *Хла* 680, *Хла* 700 и, возможно, другие формы), тогда как основная масса этого и сопровождающих пигментов функционирует как система, «собирающая» энергию.

Эффект Эмерсона и две фотохимические реакции в фотосинтезе. Наиболее интересным при исследовании спектра действия фотосинтеза и красного падения оказался тот факт, что низкий квантовый выход в темно-красной области (680—720 *нм*) можно увеличить, если дополнительно осветить клетки более коротковолновым светом (650 *нм*).

Так, если при освещении в дальней красной области (λ_1) скорость фотосинтеза была равна V_1 относ. ед., то при добавлении коротковолнового освещения (λ_2), которое само по себе соответствует фотосинтезу V_2 (т. е. при одновременном действии двух лучей, например 650 + 710 *нм*), наблюдаемая в опыте скорость $V_{1,2}$ превысит арифметическую сумму скоростей $V_1 + V_2$. Мерой такого «эффекта усиления» обычно принимают относительное увеличение скорости (k) при дополнительном освещении. Таким образом, коэффициент усиления $k = \frac{V_{1,2} - V_2}{V_1}$, где $V_{1,2}$ — скорость фотосинтеза при совместном действии двух лучей, V_1 — скорость при действии одного луча (λ_1) и V_2 — то же для второго луча (λ_2). Величина коэффициента может достигать нескольких единиц (1,2—4, т. е. 120—400%). Существенно, что фотосинтез в коротковолновой области также усиливается под действием длинноволнового света (рис. 118).

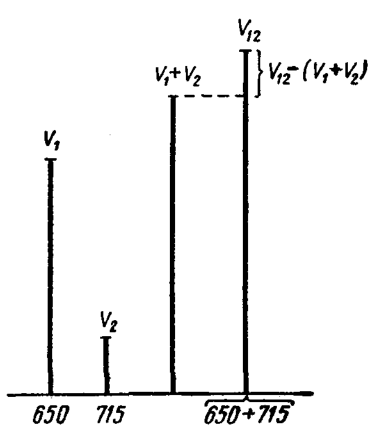


Рис. 118. Эффект усиления Эмерсона: V_1 — скорость фотосинтеза при освещении клетки нителлы в красной области (650 *нм*), V_2 — то же при освещении в дальней красной области (715 *нм*), $V_1 + V_2$ — арифметическая сумма скоростей, V_{12} — наблюдаемая в опыте скорость фотосинтеза при одновременном освещении клеток двумя лучами, $V_{12} - (V_1 + V_2)$ — величина усиления, $\frac{V_{12} - V_2}{V_1} = k$ — коэффициент усиления для V; цифры указывают длину волны действующего света

Эффект усиления сохраняется, если действие двух лучей разделено темновым интервалом в несколько секунд. Это значит, что он обусловлен медленным взаимодействием фотопродуктов, а не таким быстрым процессом, как миграция энергии; кроме того, эффект исчезает при понижении температуры.

Для объяснения эффекта усиления была выдвинута гипотеза о существовании двух самостоятельных фотохимических реакций при фотосинтезе. Одна из них осуществляется длинноволновым пигментом (длинноволновая форма хлорофилла *a* с максимумом поглощения, расположенным за основным красным максимумом 680 *нм*), а другая — коротковолновым (хлорофилл *b* с максимумом 650 *нм* или коротковолновая форма хлорофилла *a* с максимумом поглощения около 670—660 *нм*). Для эффективного фотосинтеза необходимо взаимодействие фотопродуктов этих двух реакций в определенных (стехиометрических) соотношениях. Это достигается в том случае, когда свет поглощается обеими системами в соответствующей пропорции (сбалансированное возбуждение двух фотосистем). Если же возбуждается преимущественно одна

реакция, например, длинноволновая при освещении в темно-красной области ($\lambda > 680$ *нм*), то вследствие нехватки продукта коротковолновой реакции продукт длинноволновой также не используется — эффективность фотосинтеза падает, что и объясняет красное падение квантового выхода. Как только в действие включается и коротковолновая система (при дополнительном освещении $\lambda = 650$ *нм*), избыток фотопродуктов длинноволновой системы вступает в реакцию с продуктом коротковолновой и эффективность фотосинтеза повышается, т. е. наблюдается эффект усиления фотосинтеза при дополнительном освещении.

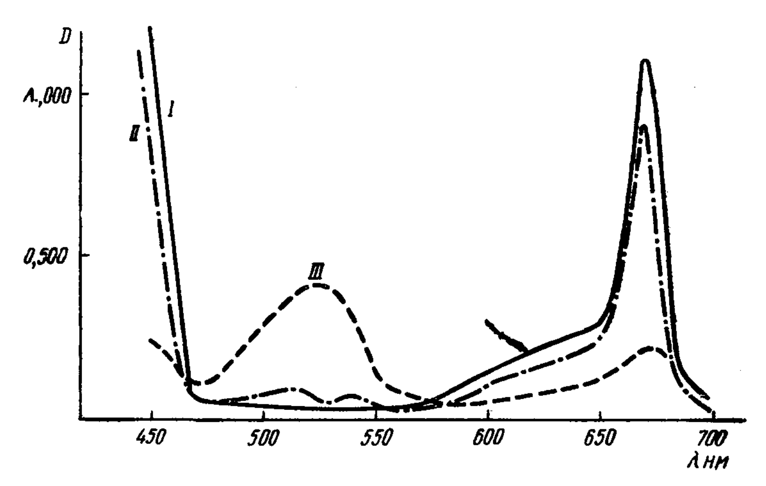


Рис. 119. Обратимая реакция фотовосстановления хлорофилла (реакция Красновского):

I — спектр поглощения раствора хлорофилла до реакции, *II* — спектр поглощения после реакции, *III* — приближенный спектр неустойчивого продукта реакции фотовосстановленной формы (через 6 *мин* после выключения света)

Механизм фотохимических реакций хлорофилла. В основе современных представлений о механизме участия хлорофилла в процессах фотосинтеза лежат закономерности, изученные на растворах пигментов. Красновским было впервые показано, что если к раствору хлорофилла в пиридине добавить небольшое количество восстановителя (например, аскорбиновой кислоты) и удалить из него воздух, то при освещении такого раствора можно наблюдать, как его зеленый цвет переходит в розово-красный. Фотопродукт имеет максимум поглощения в области 515—630 *нм*. Это быстрое превращение есть фотовосстановление хлорофилла. При пуске воздуха в эвакуированную трубку Тунберга проходит обратная реакция окисления восстановленного хлорофилла, и раствор вновь приобретает зеленую окраску (рис. 119).

Изучение механизма этой реакции показало, что после поглощения кванта света возбужденная молекула (в синглетном или

триплетном состоянии) воспринимает электроны от восстановителя. Заряженные молекулы (ионы и ион-радикалы) могут быть обнаружены по появлению проводимости при освещении растворов пигмента

$$x + h\nu \longrightarrow x^* \qquad x^* + AH \xrightarrow{e^-} x^{\dot{-}} + AH^{\dot{+}}$$

Здесь x — пигмент,

x^* — возбужденный пигмент, AH — восстановитель,

$x^{\dot{-}}$ — ион-радикал.

Затем происходит стабилизация таких «первичных восстановленных форм» с присоединением протона. В этой реакции энергия поглощенного кванта используется, таким образом, для переноса электрона и протона от восстановителя к молекуле пигмента.

$$x^{\dot{-}} + H^+ \longrightarrow xH\cdot \qquad xH\cdot + xH\cdot \longrightarrow xH_2 + x$$

Здесь x — пигмент, $x^{\dot{-}}$ — ион-радикал пигмента, $xH\cdot$ — полувосстановленная форма, xH_2 — восстановленная (красная) форма пигмента, AH — донор электрона (восстановитель).

Наиболее важным свойством фотовосстановленных форм хлорофилла является их способность отдавать полученный от восстановителя электрон другому веществу, восстанавливая его (сенсибилизированное фотовосстановление). При этом сам пигмент возвращается в исходное состояние. Так, если добавить к исследуемому раствору краситель, меняющий свою окраску при переходе в восстановленную форму (например, дихлорфенол индофенол), то при освещении такой «тройной системы» [донор электрона (аскорбиновая кислота) — сенсибилизатор (хлорофилл) — акцептор электронов (краситель)] происходит быстрое восстановление красителя. При этом фотовосстановленный пигмент не накапливается, так как, восприняв электроны от аскорбиновой кислоты, он тотчас же передает их красителю, а сам возвращается в исходное состояние. В итоге происходит восстановление акцептора электронов (B) за счет окисления донора (A), тогда как концентрация пигмента — сенсибилизатора (x) остается неизменной.

$$X^{\dot{-}} + B \xrightarrow{e^-} X + B^{\dot{-}} \qquad B^{\dot{-}} + H^+ \longrightarrow BH\cdot$$

$$2BH\cdot \longrightarrow BH_2$$

Здесь B — акцептор электронов. Описанный механизм сенсибилизированного процесса, при котором пигмент непосредственно участвует в окислительно-восстановительных реакциях переноса электрона, может служить моделью функции хлорофилла и в живой клетке.

Возникновение триплетно-возбужденных молекул и лабильных промежуточных продуктов типа свободных радикалов в ходе фотовосстановления хлорофилла обнаруживается методом ЭПР по появлению сигнала при освещении растворов хлорофилла, а также методом инициированной реакции полимеризации метилметакрилата.

В растворе удалось осуществить сенсибилизирование ряда биологически важных соединений и, в частности, восстановление пиридиннуклеотидов (НАДФ), которые служат важнейшим участником реакции фотосинтеза в живых клетках.

Наряду с обратимым фотовосстановлением хлорофилл в растворе способен и к обратимому фотоокислению. При этом молекулы пигмента под действием света отдают электроны какому-либо акцептору, например кислороду (окисляясь), а затем в ходе обратной реакции с восстановителем восполняют недостаток электронов, переходя в исходное состояние.

Схема первичных фотохимических процессов фотосинтеза. Работы Эмерсона и сотрудников и последовавшие за ними исследования с применением всего арсенала спектрофотометрических (дифференциальная и импульсная спектроскопия, изучение спектров действия с дополнительным освещением и т. д.) и биохимических методов (исследование фотофосфорилирования, цепи транспорта электрона и т. п.) позволили выдвинуть и обосновать положение о том, что в основе фотосинтеза лежит не одна, а по крайней мере две самостоятельные фотохимические реакции, сенсибилизируемые двумя различными группами пигментов. При этом роль непосредственных фотохимических участников этих реакций исполняют специфические нативные формы хлорофилла *a* и его бактериальных аналогов, входящие в различные фотохимические системы. К настоящему времени на основании этих положений предложено несколько модификаций схемы первичных процессов фотосинтеза, которые несмотря на свою гипотетичность объясняют основную совокупность экспериментальных данных. Мы остановимся на более распространенной схеме, согласно которой реакции сопряжены последовательно, т. е. так, что конечный продукт одной из них служит исходным для другой. Разделение единого продукта переноса электрона на две ступени основано на экспериментальных данных.

Так, было показано, что хлоропласты способны выделять кислород из воды, восстанавливая добавленный к суспензии краситель (реакция Хилла). При этом электрон «поднимается» на некоторый промежуточный уровень (в восстановленном красителе).

$$\text{Краситель} \xrightarrow[\text{хлоропласты}]{\text{свет}} \text{восстановл. краситель} + 1/2O_2 + H^+.$$

Позднее установлено, что реакция идет под действием света на коротковолновые пигменты — *Хл a* 670 и *Хл b* и не может осуществляться на темно-красном свету.

Аналогичный процесс осуществляется и в нормальных условиях (в целых клетках и без добавления красителя) с восстановлением некоего промежуточного вещества. Таким веществом, в частности, может быть сам хлорофилл, приобретающий под действием света способность воспринимать электроны от веществ, связанных непосредственно с окислением воды. Предполагается, что

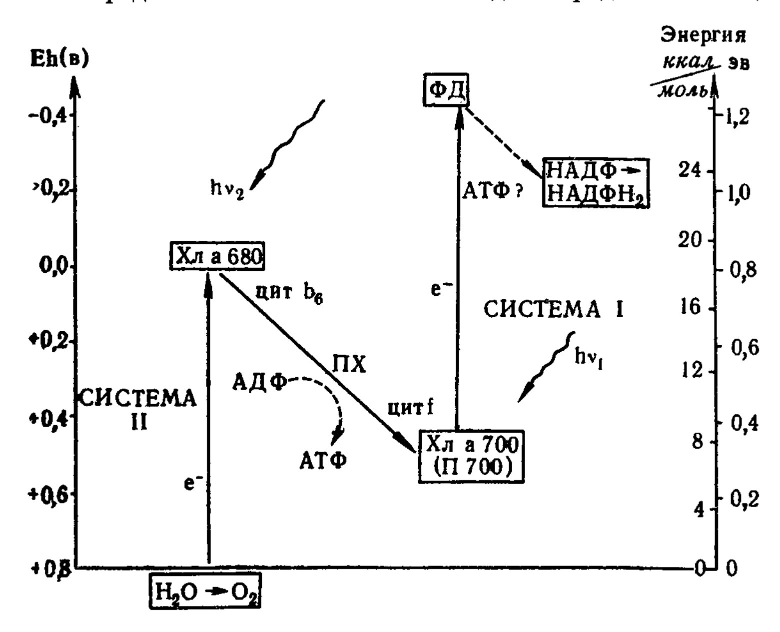


Рис. 120. Схема переноса электрона в первичных процессах фотосинтеза: *Хла* 680 — нативная форма хлорофилла *а* (гипотетический фотохимический центр системы II); *цит* — цитохром, *ПХ* — пластохинон; *ХЛа* 700 (П 700) —нативная форма хлорофилла *а* (фотохимический центр системы I), *ФД* —ферредоксин; *НАДФ* — никотинамидадениндинуклеотидфосфат; *НАДФН*$_2$ — восстановленный НАДФ; $h\nu_1$ — свет, поглощаемый системой I ($\lambda \geqslant 690$ *нм*); $h\nu_2$ — свет, поглощаемый преимущественно системой П) $\lambda \leqslant 690$ *нм*); АДФ → АТФ — фотофосфорилирование, сопряженное с переносом электрона. Слева на оси — величины окислительно-восстановительного потенциала; справа — величина запасаемой энергии

фотохимически активным в этом процессе является коротковолновая форма хлорофилла с максимумом около 680 *нм*, тогда как другие коротковолновые пигменты *Хлb* (максимум 650 *нм*), *Хл а* 670 передают (путем миграции) поглощенную энергию на этот центр. Совокупность пигментов сенсибилизирующих эту окислительную часть процессов фотосинтеза, связанную с выделением кислорода из воды, называют II-ой (коротковолновой) пигментной системой (рис. 120).

Восстановительная часть фотосинтеза, в результате которой происходит восстановление НАДФ и ферредоксина, судя по спектрам действия, осуществляется другой фотохимической системой.

Изолированное функционирование этой системы можно наблюдать при освещении фотосинтезирующих объектов наиболее длинноволновым («дальним красным») светом $\lambda \geqslant 680$ *нм*. Она получила название I, или длинноволновой, фотохимической системы.

Исследования дифференциальных спектров свет — темнота поглощения показали, что фотохимическим центром I системы служит особая форма хлорофилла. Максимальное изменение поглощения под действием света приходится на 700 *нм*, поэтому этот пигмент (по-видимому, агрегированная форма хлорофилла) обозначают символом $П_{700}$ (второй максимум в дифференциальном спектре около 430 *нм*). Под действием темно-красного света происходит уменьшение, а под действием более коротковолнового — увеличение поглощения. Изменения оптической плотности обнаружены и в темноте при варьировании окислительно-восстановительных условий (в опытах с суспензией хлоропластов). Окислительно-восстановительное титрование $П_{700}$ (т. е. определение зависимости величины дифференциального максимума от rH среды) позволило установить величину нормального окислительно-восстановительного потенциала этого пигмента (0,43 *в*). Сопоставление результатов этих опытов дало основание для вывода о том, что поглощение света длинноволновой системой вызывает окисление $П_{700}$ с «подъемом» электрона, идущего на восстановление последующего акцептора, а возбуждение коротковолновой системы — восполняет эту потерю электрона за счет электрона, поставляемого от воды, т. е. приводит к восстановлению окисленного $П_{700}$ (см. схему рис. 120). Измерения электронного парамагнитного резонанса показали, что процесс протекает через стадию образования свободных радикалов.

Установлено, что акцептором, воспринимающим электрон, «поднятый» фотохимической системой I, служит ферредоксин, окислительно-восстановительный потенциал которого достаточен (0,43 *в*) для восстановления НАДФ (0,32 *в*). Последняя реакция — окисление фотовосстановленного ферредоксина и восстановление НАДФ — происходит при участии особого флавопротеинового пигмента хлоропластов.

Для поддержания непрерывного потока электронов, восстанавливающих НАДФ, необходимо сопряжение двух фотохимических систем. В качестве промежуточных переносчиков электрона выступают цитохромы (цит. $в_6$ 0,0 *в* и цит. *с* 0,4 *в*), а также хиноны (пластохинон) и цианин. Так, при исследовании дифференциальных спектров поглощения установлено, что под действием света, поглощаемого системой II, цитохромы восстанавливаются, тогда как при возбуждении системы I — окисляются.

Темновой «спуск» электрона между II и I системами используется для запасания энергии в АТФ без дополнительного поглощения кванта; этот тип фотофосфорилирования, происходящий «попутно» с основным окислительно-восстановительным процессом, получил название нециклического фотофосфорилирования. Другой путь образования АТФ связан уже с обратным спуском электрона при реакции восстановленного акцептора и требует затраты кванта (циклическое фотофосфорилирование). При этом образуются дополнительные количества АТФ. Локализация реакций фотофосфорилирования, их число и способ сопряжения с основным окислительно-восстановительным процессом остаются предметом дискуссии и исследований.

Расчленение единого процесса подъема электрона на две ступени может быть осуществлено экспериментально двумя способами — спектрально и с помощью избирательных ингибиторов. Так, при освещении фотосинтезирующих организмов темно-красным светом 700—720 *нм* осуществляется только восстановительная часть процесса — восстановление ферредоксина и НАДФ, а также нециклическое фотофосфорилирование.

В этом случае функционирует только система I; для длительного изолированного действия в отсутствие электронов, поставляемых от воды, она должна снабжаться электронами за счет какого-либо введенного извне донора электронов (система аскорбиновая кислота — краситель).

При освещении коротковолновым светом (например, 650 *нм*) функционирует преимущественно система II, однако вследствие того, что в этой же области частично поглощают пигменты I системы, а также, вероятно, и вследствие миграции энергии с коротковолновых на длинноволновые пигменты в процесс частично включается и длинноволновая система.

Действие ингибитора — диурона разобщает две системы, отключая систему II (прерывая поток электронов). Если при этом к хлоропластам добавить акцептор электронов (краситель), то можно изучать изолированное функционирование системы II, которая будет фотовосстанавливать акцептор. С другой стороны, выключив систему II и заменив ее донором электронов (тот же краситель, поддерживаемый в восстановленном состоянии), можно наблюдать изолированное действие системы I. Возвращаясь к схеме первичных процессов в целом, можно подвести общий итог. Экспериментальные результаты показывают, что для восстановления CO_2 в цикле восстановления углерода необходимы две молекулы восстановленного НАДФ и три молекулы АТФ, поставляемого циклическим и нециклическим фотофосфорилированием. Для восстановления двух молекул НАДФ необходим перенос четырех электронов (или два атома водорода на одну молекулу), т. е. поглощение восьми квантов света (по одному на подъем электрона каждой из двух последовательно включенных фотохимических систем). Эти

четыре электрона удаляются из воды, что приводит к соответствующему выделению одной молекулы O_2 (см. рис. 120 и 121). Таким образом, согласно схеме, для утилизации одной молекулы CO_2 и выделения одной молекулы кислорода необходимо поглощение 8 квантов. Следовательно, квантовый выход $= \frac{\text{количество молекул кислорода или } CO_2}{\text{количество поглощенных квантов}}$ должен составлять 1/8. Это согласуется с большинством экспериментов, в которых определялся квантовый выход фотосинтеза в целом и составляющих его реакций (1/12—1/8).

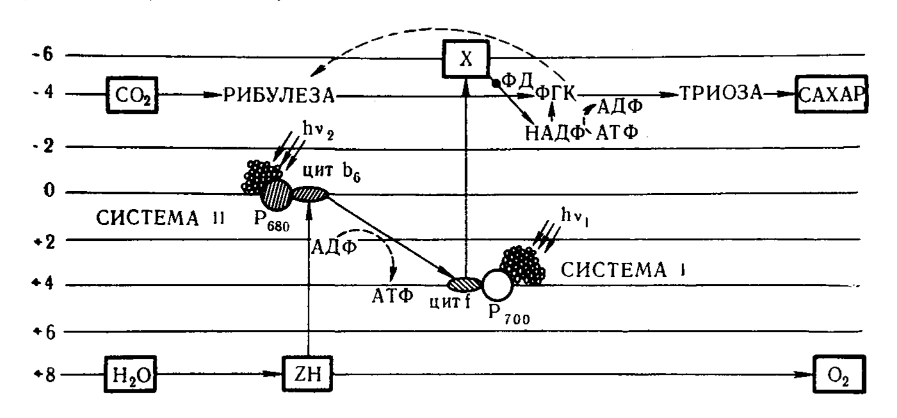


Рис. 121. Расширенная схема переноса электрона в первичных процессах фотосинтеза (по Рабиновичу): *ZH* — промежуточный донор электрона; *X* — промежуточный акцептор электрона; *ФГК* — фосфоглицериновая кислота; остальные обозначения те же что и на рис 120

Наряду с гипотезой о последовательном соединении фотореакций, существуют схемы с их параллельным включением, которые также удовлетворительно объясняют многие экспериментальные факты. Однако и в этих схемах, как правило, предполагается, что для переноса каждого электрона необходимо два кванта. Выдвигались также предположения, по которым «подъем» электрона (от воды до ферредоксина) осуществляется при поглощении лишь одного кванта, но в этом случае квантовый выход процесса должен быть гораздо более высоким, чем 1/8, что плохо согласуется с большинством экспериментальных данных.

Целый ряд эффектов, связанных с протеканием первичных процессов фотосинтеза, таких, как дифференциальные изменения поглощения пигментов и цитохрома, появление сигнала ЭПР при освещении, наличие фотопроводимости, длительное послесвечение и т. д., оказалось возможным наблюдать не только при обычных, но и при очень низких температурах (в некоторых случаях при 1° К). Эти факты указывают на физическую природу некоторых элементарных процессов, не связанных с диффузией молекул.

К таким процессам, по-видимому, относятся перенос электрона между близкорасположенными молекулами пигмента и цитохрома (комплекс с переносом заряда), появление неспаренных электронов. Некоторые исследователи распространили эту возможность на более широкий круг явлений, выдвинув гипотезы, по которым весь комплекс первичных процессов, вплоть до биохимических стадий, можно описать с точки зрения теории фотопроцессов в полупроводниках. Согласно одной из таких гипотез

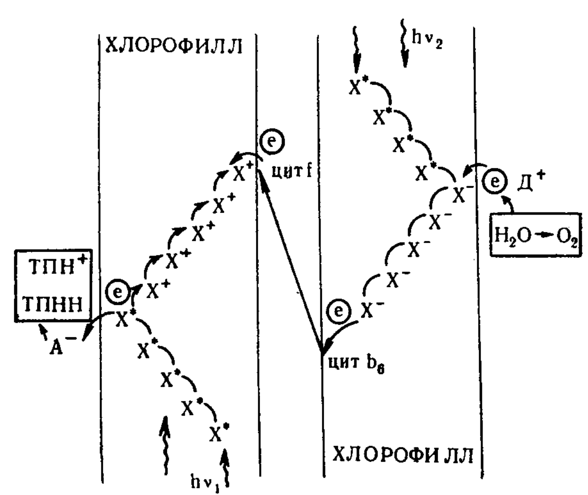


Рис. 122. Гипотетическая схема полупроводниковых процессов при фотосинтезе (по Калвину и Андроесу): X^* — миграция экситона; X^- — миграция электрона; X^+ — миграция дырки; A^- — конечный акцептор электрона; $Д^+$ — донор электрона, поглощаемый свет

(рис. 122), поглощение кванта одним типом пигмента приводит к выбиванию электрона (с образованием положительного ион-радикала, который эквивалентен дырке) пигмента; электрон идет на восстановление акцептора в растворе, примыкающем к полупроводниковой структуре.

В настоящее время гипотезы о чисто физическом механизме представляются менее доказанными, чем более распространенные представления о фотохимических реакциях. Вместе с тем ряд экспериментальных данных — таких, как существование полупроводниковых свойств у изолированных пигментов (пленки хлорофилла и каротина) и у пленок сухих хлоропластов, побуждает исследователей учитывать и такого рода возможности, особенно интересные для биофизики.

Механизм действия пигментов (форм хлорофилла), выполняющих функцию фотохимических центров, пока точно не известен,

однако дифференциальные изменения поглощения, сопоставления с исследованием в растворах и другие данные свидетельствуют о том, что один из центров претерпевает обратимое восстановление, захватывая электрон (а затем передавая его партнеру), а другой — обратимое окисление, т. е. будучи возбужден, отдает электрон акцептору, восполняя его недостаток при последующем взаимодействии с промежуточным донором.

В дифференциальном спектре поглощения (свет минус темнота) фотосинтезирующих организмов появляются максимумы, характерные для поглощения как фотовосстановленной, так и фотоокисленной формы пигмента в растворе (в области 515—530 *нм*). В механизме фотосинтеза реализуются, по-видимому, обе возможности, заложенные в молекуле пигмента — способность к обратимому фотовосстановлению и к обратимому фотоокислению. Пока трудно расчленить эти процессы в живой клетке. Появление сигналов ЭПР при освещении хлоропластов и клеток указывает на то, что они совершаются через стадию свободных радикалов.

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТА НА НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И БЕЛКИ

Проблема механизма действия ультрафиолетового излучения на белки и аминокислоты имеет важное общебиологическое значение. С момента возникновения жизни доклеточные образования и одноклеточные организмы находятся под сильным воздействием ультрафиолетового облучения и по необходимости должны были приспособиться к действию этого фактора.

Ультрафиолетовое облучение, приводящее к гибели клеток, появлению мутации или инактивации клеток, имеет важное практическое значение в медицине, генетике микроорганизмов и т. д. С другой стороны, представляет интерес проблема стимулирующего действия ультрафиолета на биологические и ферментативные процессы и абиогенного синтеза биологически важных веществ.

Фотохимические реакции в нуклеиновых кислотах

В далекой ультрафиолетовой области спектра (200—300 *ммк*) сильно поглощают лучи только азотистые основания нуклеиновых кислот. По этой причине именно они и подвергаются фотохимическим превращениям при ультрафиолетовом облучении.

Изучение фотохимических превращений пуриновых и пиримидиновых оснований под действием ультрафиолета производят обычно, используя методы биохимического анализа, например, с помощью бумажной хроматографии, анализируя состав изучаемого раствора до и после ультрафиолетового облучения. Чтобы

получить достаточное количество продуктов фотохимической реакции, изучаемый раствор наливают в кварцевую «рубашку», которая окружает бактерицидную лампу. В этих условиях интенсивное ультрафиолетовое излучение бактерицидной лампы (253,7 *нм*) поглощается равномерным слоем раствора изучаемого вещества, который окружает лампу со всех сторон. Накопленные продукты фотохимической реакции можно выделить в чистом виде и изучить их строение. Наиболее важные реакции азотистых оснований, идущие при действии ультрафиолетовых лучей, — это фотохимическое окисление, фотохимическое гидрирование (присоединение воды) и фотодимеризация:

Фотоокисление дезаминирование аденина:

```
N = C — NH2                 N = C — OH
|   |                       |   |
CH  C — N       hν          CH  C — N
‖   ‖     >CH  ———→         ‖   ‖     >CH
N — C — NH     +H2O         N — C — NH
               −NH3
  Аденин                      Гипоксантин
```

При длительном облучении азотистых оснований или нуклеотидов происходит также разрыв колец и другие реакции, связанные отчасти с дальнейшим превращением первичных фотопродуктов под действием ультрафиолетовых лучей.

Квантовые выходы фотохимического разрушения азотистых оснований и инактивации нуклеиновых кислот весьма невелики. Каждая молекула азотистого основания в нуклеиновой кислоте должна поглотить сотни фотонов прежде, чем произойдет фотохимическая реакция.

Фотохимические реакции, в которые вступают азотистые основания, в конечном счете приводят к повреждению молекулы нуклеиновой кислоты, однако основную роль играют при этом процессы димеризации тиминовых колец.

Основное действие ультрафиолетовых лучей на нуклеиновую кислоту заключается в том, что последняя теряет биологическую активность. Так, например, инфекционная нуклеиновая кислота вируса табачной мозаики при облучении ультрафиолетом быстро теряет способность вызывать заражение листьев табака.

Для того чтобы судить о том, какие именно группы в нуклеиновой кислоте ответственны за фотохимическую инактивацию всей макромолекулы, необходимо измерить спектры действия этого фотопроцесса. Как уже говорилось выше, спектры действия должны совпадать по форме со спектром поглощения вещества, ответственного за фотохимический или фотобиологический эффект. В результате изучения спектра действия инактивации РНК вируса табачной мозаики было показано, что он близок к спектру поглощения урацина. Спектр действия инактивации двухцепочечной ДНК аналогичен спектру поглощения суммы всех азотистых осно-

ваний. Это означает, что поглощение света урацилом в РНК и всеми основаниями в ДНК приводит в конце концов к инактивации всей макромолекулы. Значит ли это, что фотохимическая реакция происходит именно в тех азотистых основаниях, которые поглотили действующий квант? Конечно, нет. Уже давно исследователи предполагали, что энергия кванта, поглощенного в каком-либо азотистом основании, может передаваться соседним основаниям и, таким образом, переноситься (мигрировать) по всей цепочке нуклеиновой кислоты до тех пор, пока не растратится в каком-нибудь месте в тепло или не израсходуется на фотохимическую реакцию. Недавно были получены прямые экспериментальные доказательства такого процесса. К нуклеиновой кислоте (ДНК тимуса теленка) присоединяли флуоресцирующий краситель, акридиновый оранжевый. Спектр возбуждения люминесценции такого комплекса оказался близким к спектру поглощения всего комплекса, а не только к спектру поглощения одного красителя. Было показано, что 33% энергии, поглощенной в нуклеиновой кислоте, передается на краситель.

Несомненно, процессу «эстафетной» миграции энергии между основаниями нуклеиновой кислоты (миграция экситона) способствует то, что азотистые основания в ДНК расположены наподобие стопки книг на полке: они подвинуты близко друг к другу и плоскости их колец параллельны.

Итак, в нуклеиновых кислотах спектры действия говорят о том, какие группы поглощают действующие кванты, но вследствие миграции энергии не показывают, в каких именно группах происходит фотохимический процесс. Казалось бы, можно произвести облучение нуклеиновой кислоты, провести ее гидролиз, а затем биохимическими методами выяснить, какие продукты накопились в результате такого облучения. В фотохимических исследованиях было обнаружено, что при облучении нуклеиновой кислоты в ней происходит присоединение воды к молекулам урацила и цитозина примерно с такой же эффективностью, как и при облучении растворов этих соединений. Однако существенно, что нуклеиновая кислота полностью инактивируется до того, как успевает гидрироваться заметное количество урацила или цитозина. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что главной реакцией, приводящей к инактивации ДНК, можно считать реакцию димеризации тимина. Две молекулы тимина в двойной спирали ДНК никогда не расположены рядом. Более того, в силу комплементарности тяжей в ДНК они никогда не расположены точно напротив друг друга. Поэтому для того, чтобы они могли прореагировать, необходимо местное расплетение тяжей ДНК, которые закрепляются в результате образования сшивки: димеризации тимина. Таким образом, в результате экспериментальных исследований было установлено, что действие ультрафиолета на ДНК определяется тремя процессами:

1. Расплетение комплементарных тяжей ДНК около молекул тимина (локальная денатурация). Этот процесс, а следовательно, и эффективность действия ультрафиолета на ДНК можно усилить нагреванием.

2. Последующая димеризация двух молекул тимина.

3. Образование «сшивки» между тяжами, которое закрепляет локальную денатурацию.

Действие ультрафиолетового излучения на белки

Вторым компонентом клетки, который подвержен разрушительному действию ультрафиолетовых лучей, оказываются белки. При действии ультрафиолета на растворы белков наблюдается помутнение раствора, изменение вязкости, изменение скорости оседания в ультрацентрифуге, изменение оптического вращения: короче говоря, появляются все признаки денатурации белка. Если облучать биологически активные белки или полипептиды: ферменты, антитела, гормоны или антибиотики (например, грамицидин), то уже через несколько минут облучения биологическая активность такого вещества резко падает.

Фотохимическим превращениям при ультрафиолетовом облучении подвергаются также и растворы чистых аминокислот: происходит окисление ароматических групп и цистеина, разрыв дисульфидных связей.

Основное поглощение света белками в области 200—400 *нм* обусловлено ароматическими аминокислотами — триптофаном, тирозином и фенилаланином, а также цистином. Измерения спектра действия фотоинактивации ферментов показали, что они весьма близки к спектру поглощения суммы этих аминокислот. Таким образом, именно эти группы белковой макромолекулы в основном ответственны за поглощение ультрафиолета, вызывающего повреждающее действие. Квантовый выход фотоинактивации ферментов невысок ($10^{-3} — 5 \cdot 10^{-2}$).

Первичные фотохимические реакции в ароматических аминокислотах

Поскольку ароматические аминокислоты поглощают основную долю квантов, разрушающих фермент, естественно предположить, что они сами при этом разрушаются. Факты подтверждают такое предположение. Во всех случаях, когда наблюдалась инактивация ферментов под действием излучения в области 260—280 *ммк* (где поглощают тирозин и триптофан), одновременно происходило разрушение одной из этих аминокислот, что проявляется, в частности, в изменении спектра поглощения белков. Эти качествен-

ные наблюдения не позволяют, однако, ответить на вопрос, сколько тирозиновых или триптофановых остатков в белке должно разрушиться, чтобы произошла инактивация фермента. Ответ на этот вопрос был получен лишь в немногих случаях путем сопоставления «поперечного сечения» инактивации белка и «поперечного сечения» разрушения той или иной аминокислоты в белке. Было показано, например, что в пепсине «мишени» для инактивации фермента и для разрушения триптофана совпадают по величине. Иначе говоря, квант должен попасть в какую-то определенную молекулу триптофана и разрушить ее (поразить мишень), чтобы произошла инактивация. Поскольку в данном случае разумеется, что одновременно поражаются и иные аминокислотные остатки, в частности, разрушаются другие остатки триптофана, однако не это приводит к инактивации, а лишь поражение определенного остатка, который существен для сохранения активности фермента и возможно непосредственно входит в его активный центр. В трипсине поражение любого из 3—4 остатков приводит к инактивации.

Схема фотохимических процессов в ароматических аминокислотах и белках

1. Поглощение света аминокислотой

$$AH + h\nu \longrightarrow AH^*$$

2. Фотоионизация

$$AH^* \longrightarrow AH^{+}\cdot + \dot{e}^- \longrightarrow A\cdot + H^+ + e^-$$

в растворах

3*а*. Образование перекисных радикалов

$$A\cdot + O_2 \longrightarrow AOO\cdot$$

3*б*. Сенсибилизированное образование радикалов. Например:

$$\bar{e} + H^+ + H_2N - R \longrightarrow$$
$$\longrightarrow NH_3\uparrow + \cdot R$$

4*а*. Образование устойчивых продуктов окисления

Диоксифенилаланин (ДОФА): $HO-C_6H_3(OH)-CH_2-CH(NH_2)COOH$ $\longrightarrow$ Формилкинуренин

в белках

3*в*. Образование устойчивых фотопродуктов ароматических аминокислот

4*б*. Инактивация фермента

Первая стадия фотохимического процесса, следующая за поглощением кванта,— фотоионизация — проходит за 5—20 *мксек* (при комнатной температуре) и может быть исследована только

с использованием метода импульсного фотолиза. Гроссвейнером и сотрудниками было показано, что в растворах тирозина и триптофана через 5 *мксек* после облучения наблюдаются характерные максимумы поглощения в красной и ближней инфракрасной области спектра, которые были идентифицированы как полосы сольватированного (т. е. захваченного молекулами растворителя) электрона. Этот электрон быстро реагирует с другими молекулами, в частности, с молекулами растворителя, и полоса его поглощения исчезает. Еще быстрее сольватированный электрон реагирует с кислородом, поэтому наблюдать его появление можно только в тщательно деаэрированных растворах. Однако поглощение сольватированного электрона можно наблюдать и на обычном спектрофотометре, если облучать замороженные растворы тирозина и триптофана, охлажденные до температуры жидкого азота, в этих условиях сольватированные электроны не рекомбинируют. Однако обнаружено, что при —196° они исчезают под действием длинноволнового излучения видимого, например, красного света. При этом электрон вновь соединяется с радикалом аминокислоты, образуется возбужденная аминокислота и наблюдается «индуцированная» красным светом люминесценция. Схема этих процессов может быть выражена следующими уравнениями.

Фотоионизация под действием ультрафиолетовых лучей:

$$AH + h\nu_1 \longrightarrow AH^{+}\cdot + \bar{e}$$

Рекомбинация под действием красных лучей и люминесценция:

$$AH^{+}\cdot + \bar{e} + h\nu_2 \longrightarrow AH^{*} \longrightarrow AH + h\nu_3$$

Обратная реакция может протекать не только под действием красных лучей, но и при нагревании. При этом наблюдается свечение, называемое термолюминесценцией.

Дальнейшая судьба образующихся радикалов различна в растворах аминокислот и в белках.

В растворах свободных аминокислот в отсутствие кислорода происходит рекомбинация продуктов фотореакции и в результате создается впечатление, что при комнатной температуре фотохимический процесс вообще не происходит. В присутствии кислорода происходит взаимодействие радикала с кислородом и образуются перекисные радикалы. Характерным свойством таких радикалов является их способность к рекомбинации, сопровождающаяся хемилюминесценцией растворов; хемилюминесценция растворов тирозина и триптофана после облучения и в самом деле имеет место. В дальнейшем протекает целая серия совершенно неизученных реакций, в результате которых образуются первые устойчивые продукты фотоокисления тирозина и триптофана: диоксифенилаланин и формилкинуренин (см. схему на стр. 377).

В белке разыгрываются реакции совершенно иного типа. Радикал аминокислоты, взаимодействуя с окружающими группами, переходит в устойчивые продукты, химическая природа которых малоизучена, но которые имеют характерные (отличающиеся от исходной аминокислоты и от продуктов фотоокисления) спектры поглощения и люминесценцию. Наряду с этим протекает серия реакций, индуцированная вторым продуктом фотоионизации — сольватированным электроном. Сольватированный электрон — исключительно сильный восстановитель, более энергичный, чем даже атомарный водород. Он легко вступает в реакцию с молекулами органических соединений. Хорошо изучена, например, методом ЭПР реакция взаимодействия сольватированного электрона с аминокислотами, в результате которой образуется радикал и выделяется аммиак (Азизова):

$$H^+ + \bar{e} + \underset{\text{Аланин}}{H_2N-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-CH_3} \rightarrow NH_3\uparrow + \underset{\text{Радикал}}{HOOC-\dot{C}H-CH_3}$$

Выделение аммиака происходит и при ультрафиолетовом облучении белков.

Трудно сказать, проиходит ли инактивация ферментов в результате разрушения самой ароматической аминокислоты, поглотившей квант света, или же в результате индуцированного сольватированным электроном химических реакций в других аминокислотах. Возможно, в разных белках эти две причины имеют разное относительное значение.

Повреждение макромолекулы белка в целом и ее инактивация связана не только с описанной выше деструкцией ароматических остатков, но и с нарушением нативной конфигурации белка.

Конформационные изменения макромолекулы могут наступать, например, вследствие диссоциации протона с последующим разрывом водородной связи. Взаимодействие радикала ароматической аминокислоты с группами соседней пептидной цепи приводит к образованию «сшивки» между цепями и закреплению нарушенной конфигурации.

Существенно подчеркнуть, что ароматические аминокислоты часто входят в состав активных центров ферментов.

Первичные фотопроцессы, развертывающиеся в белках под действием ультрафиолета, возможно, включают в себя явления, характерные для полупроводников. Об этом говорит появление фотопроводимости при освещении тонких пленок белка, помещенных между двумя электродами. Интересно отметить, что видимый свет, поглощаемый фотопродуктами, образовавшимися под действием ультрафиолета, может приводить к обратным процессам с восстановлением исходной молекулы аминокислоты. Этот процесс лежит в основе фотореактивации белков.

ГЛАВА XII

ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

I. ФИЗИКА ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

В этом разделе книги будут рассмотрены различные стороны биологического действия ионизирующих излучений. Из всего спектра электромагнитных излучений с разной длиной волны, а именно: радиоволны, инфракрасные лучи, видимый свет, ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи только рентгеновские и гамма-лучи относятся к ионизирующим излучениям (рис. 123). К ионизирующим излучениям относятся также и корпускулярные излучения: β- и α-лучи радиоактивных веществ; нейтронное излучение; искусственно получаемые потоки ускоренных электронов, протонов, дейтронов и других частиц, а также космические лучи.

Механизм поглощения энергии разных по своей физической природе излучений (электромагнитные и корпускулярные излучения) неодинаков, но в конечном счете он сводится к возникновению в поглощающей среде ионов и возбужденных молекул.

О строении атомов и молекул в настоящее время имеется много вполне достоверных сведений. Известно, что атом по своей структуре представляет сложную систему, состоящую из находящегося в центре атома положительно заряженного ядра диаметром не более $1{,}6 \cdot 10^{-12}$ *см* и отрицательно заряженных электронов, вращающихся вокруг ядра на различных орбитах. Отрицательный заряд электронов равен положительному заряду ядра, при этом атом в целом оказывается электрически нейтральным.

При прохождении ионизирующего излучения через вещество происходит взаимодействие излучения с атомами и молекулами вещества с образованием ионов и возбужденных атомов и молекул.

Процесс ионизации заключается в том, что быстро летящая заряженная частица взаимодействует с электроном на внешней оболочке атома или молекулы вещества, что приводит к разрыву связи этого электрона с соответствующим атомом или молекулой. Атомы, потерявшие в результате ионизации электроны, оказываются заряженными положительно. Это положительные ионы. Электрон, сорванный с оболочки атома, присоединяется к нейтральному атому или молекуле, образуя отрицательный ион. Таким образом, в результате ионизации возникают два иона с противоположными знаками.

Атомы и молекулы называют возбужденными в том случае, если при столкновении с ионизирующей частицей они приобретают избыточную энергию в результате перемещения электронов на оболочках атомов. Энергия, затраченная на переход электронов с ближней к ядру оболочки на более далекую, называется энергией возбуждения. При обратном переходе электрона с верхнего «возбужденного» уровня на нижний уровень эта энергия излучается в виде фотонов видимого, ультрафиолетового света или рентгеновских лучей.

Длина волны, *см*			Тип излучения	Частота, *сек*
				10^{-1}
100 000 000 000		10^{11}		10^{0}
10 000 000 000		10^{10}		10^{1}
1 000 000 000		10^{9}		10^{2}
100 000 000		10^{8}		10^{3}
10 000 000		10^{7}		10^{4}
1 000 000		10^{6}		10^{5}
100 000	1 *км*	10^{5}		10^{6}
10 000		10^{4}	Радиоволны	10^{7}
1 000		10^{3}		10^{8}
100	1 *м*	10^{2}		10^{9}
10		10^{1}		10^{10}
1		10^{0}		10^{11}
0,1		10^{-1}		10^{12}
0,01		10^{-2}		10^{13}
0,001		10^{-3}	Инфракрасные лучи	10^{14}
0,000 1	1 *мк*	10^{-4}		10^{15}
0,000 01		10^{-5}	Видимый свет	10^{16}
0,000 001	1 *ммк*	10^{-6}	Ультрафиолетовые лучи	10^{17}
0,000 000 1		10^{-7}	Рентгеновы лучи	10^{18}
0,000 000 01	1 Å	10^{-8}		10^{19}
0,000 000 001		10^{-9}	γ-лучи	10^{20}

Рис. 123. Спектр электромагнитного излучения

Электрон останется в пределах атома тогда, когда поглощенная атомом энергия не превышает 10 *эв*[1]. Ясно, что возбужденный атом подвергнется менее глубоким изменениям, чем ионизированный атом. В свою очередь, энергия возбуждения превышающая энергию связи электрона в атоме, образует отрицательный ион. Вероятность процесса возбуждения больше, чем процесса ионизации, так что на каждую пару ионов образуется два-три возбужденных атома и молекулы. Электрон, вырванный из атома, способен (в зависимости от рода ионизирующего излучения и от энергетического уровня, с которого он вырван) произвести одну или несколько ионизаций до тех пор, пока он не будет захвачен ней-

[1] Электрон-вольт — это энергия, которую приобретает электрон, проходя электрическое поле с разностью потенциалов в 1 вольт.

тральным атомом. Если энергия первичного электрона около 100 *эв*, то все производимые им ионизации будут происходить совсем рядом — образуется скопление ионов. При большой энергии электрон может пройти большой путь, создавая новые электроны, так называемые δ-электроны, также способные к ионизации.

Энергия, поглощенная веществом, в итоге превращается в тепловую. Причем, конечному нагреву ткани предшествует локальный процесс поглощения энергии в пределах небольших групп атомов. Незначительное увеличение температуры при поглощении даже больших доз ионизирующей радиации указывает на то, что природа наблюдаемых биологических эффектов определяется ионизацией и возбуждением атомов, ведущих к химическому изменению молекул.

ИСТОЧНИКИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Рентгеновские лучи. *Рентгеновским излучением называется электромагнитное излучение с длиной волны менее 10 Å.* Рентгеновские лучи образуются в результате торможения быстрых электронов в поле атома. Обычно источниками рентгеновских лучей служат рентгеновские трубки. В этих трубках при торможении в области анода сильно ускоренных электронов, испускаемых нагретым катодом, получается рентгеновское излучение (рис. 124). К электродам прикладывается высокое постоянное напряжение — приблизительно 50—100 *кв*. Когда спираль катода не нагрета, ток, естественно, не течет, так как при высоком вакууме нет никаких носителей электричества между электродами. Как только спираль катода нагреется, электроны начинают освобождаться из раскаленного катода и ускоряться по направлению к аноду (антикатоду). Электроны приближаются к атомам металла, из которого изготовлен анод, и испытывают резкое торможение в электрическом поле атомов. Кинетическая энергия электронов при этом превращается в энергию излучения. Причем, когда электрон ударяется об антикатод, только 0,2% энергии испускается в виде рентгеновских лучей, а остальная часть, около 99,8%, превращается в тепло.

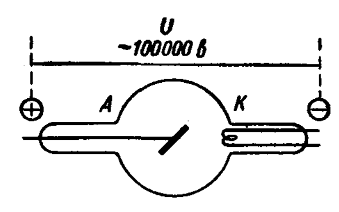


Рис. 124. Схема включения рентгеновской трубки: V — источник высокого напряжения, прикладываемого между катодом (*K*) и анодом (*A*)

Часть электронов, бомбардирующих анод, выбивает электроны из внутренних оболочек атомов материала анода. Так как энергия связи электронов с атомом на различных орбитах различна, то и энергия фотонов рентгеновских лучей характерна для той орбиты, с которой был выбит электрон. Как правило, анод рентгеновских

трубок изготавливают из металлов с большим атомным номером и испускаемое им излучение состоит из ряда характеристических длин волн, каждая из которых соответствует определенной орбите в атоме. Максимальная энергия фотонов не будет превышать максимальной энергии электронов, попадающих на анод, но может иметь любые значения ниже ее. На рис. 125 показан состав излучения, испускаемого трубкой с молибденовым антикатодом. Четыре линии принадлежат к так называемому линейчатому (или характеристическому) спектру, который накладывается на сплошной спектр излучения.

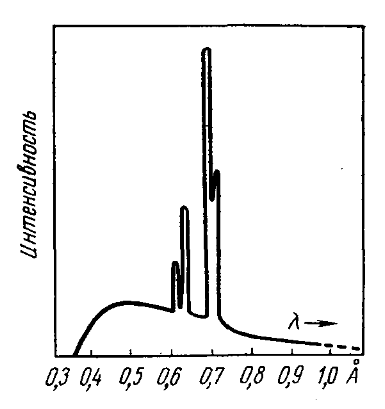


Рис. 125. Спектр излучения, испускаемого рентгеновской трубкой с молибденовым антикатодом

Гамма-излучение. *Гамма-излучение представляет собой коротковолновое электромагнитное излучение, испускаемое возбужденными атомными ядрами.* Это излучение наблюдается при радиоактивных превращениях атомных ядер и при ядерных реакциях. γ-Лучи с энергией примерно до 100 *Кэв*[1] (мягкие γ-лучи) ничем, кроме своего ядерного происхождения, не отличаются от рентгеновского излучения. Наиболее важной характеристикой γ-лучей является энергия отдельного кванта E_γ.

$$E_\gamma = h\nu, \tag{12.1}$$

где h — постоянная Планка, ν — частота излучения.

При радиоактивном распаде ядер обычно наблюдаются γ-кванты с энергиями от 10 *Кэв* до 5 *Мэв*, а при ядерных реакциях —до 20 *Мэв*. Ядро, так же как и атом, представляет собой квантовомеханическую систему с дискретным набором энергетических уровней. Энергия γ-кванта, испускаемого при переходе возбужденного ядра в более низкое энергетическое состояние, равна разности энергии между двумя уровнями (i, p), между которыми происходит γ-переход:

$$E_\gamma = E_i - E_p. \tag{12.2}$$

Вследствие этого γ-излучение ядер имеет линейчатый спектр. На рис. 126 представлен в качестве примера спектр γ-лучей, возникающих при радиоактивном превращении Ca^{47} в Sc^{47}.

В случае легких ядер γ-спектр состоит из ряда монохроматических линий, хорошо разделяемых одна от другой. У более тяжелых ядер плотность уровней возрастает, что приводит к более

[1] 1 *Кэв* (килоэлектронвольт) = 10^3 *эв*, 1 *Мэв* (мегаэлектронвольт) = $= 10^6$ *эв*.

сложным спектрам γ-лучей, испускаемых при радиоактивном распаде.

Переход между уровнями возбужденного ядра не обязательно сопровождается излучением γ-кванта. Энергия перехода $E_i - E_p$ может быть также передана ядром непосредственно одному из электронов электронной оболочки атома, который вследствие этого покидает атом. Такой процесс называется внутренней конверсией. Если энергия перехода $E_i - E_p > 2mc^2$, то при γ-переходе может образоваться пара: электрон и позитрон. Здесь mc^2 — энергия покоя электрона, равная 511 *Кэв*.

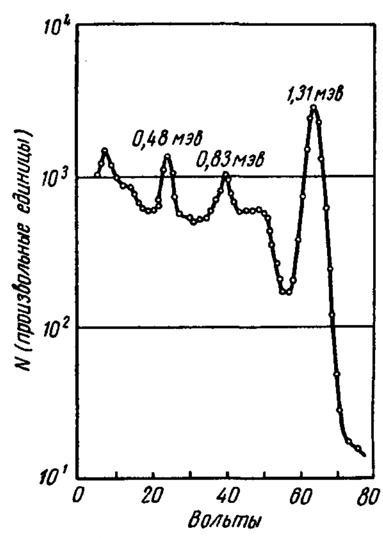


Рис. 126. Спектр γ-лучей, возникающих при радиоактивном превращении Ca^{47} в Sc^{47}:

по оси абсцисс — величина импульса (в вольтах), пропорциональная энергия γ-лучей, по оси ординат — число импульсов в единицу времени (в произвольных единицах)

В качестве γ-излучателя при проведении радиобиологических исследований очень часто применяют радиоактивный изотоп Co^{60} с периодом полураспада 5,3 года. При распаде Co^{60} превращается в никель Ni^{60}. Возбужденное ядро никеля, образующееся при этом, переходит в нормальное состояние с последовательным испусканием двух γ-квантов, один с энергией 1,17 *Мэв*, второй 1,33 *Мэв*.

Поглощение рентгеновского и γ-излучения. При взаимодействии с веществом рентгеновских или γ-лучей, имеющих одну и ту же энергию фотонов, механизм поглощения энергии будет одинаковым и эти два вида излучений будут различаться только своим происхождением.

Пучок рентгеновского или γ-излучения с интенсивностью I_0, проходя слой вещества толщиной x (*см*), испытывает ослабление интенсивности по экспоненциальному закону:

$$I = I_0 e^{-kx}, \qquad (12.3)$$

графическое изображение которого дано на рис. 127. Коэффициент k называется коэффициентом поглощения данного вещества и имеет размерность $см^{-1}$.

Часто толщину вещества x выражают в граммах на $см^2$, тогда коэффициент k имеет размерность $г/см^2$ и называется массовым коэффициентом поглощения. Для воды зависимость массового коэффициента поглощения от энергии рентгеновского, или γ-излучения представлена на рис. 128. В зависимости от энергии кванта его поглощение определяется одним из трех процессов: фотоэлект-

рическим поглощением, комптоновским рассеянием, образованием электронно-позитронных пар.

Фотоэлектрический эффект. При фотоэлектрическом поглощении γ-квант с энергией $E_1 = h\nu$ поглощается атомом с испусканием быстрого электрона e^-, обычно из внутренних оболочек атома (рис. 129, *А*). Электрон при этом получает энергию E_2, т. е. энергию кванта E_1 за вычетом энергии связи электрона. Фотоэлектрический эффект определяет основное поглощение мягкого рентгеновского и γ-излучения при энергиях от нескольких тысяч электрон-вольт до сотен килоэлектрон-вольт. При этом коэффициент поглощения растет с увеличением атомного номера элемента пропорционально четвертой степени заряда ядра и обратно пропорционально кубу энергии γ-кванта. Образующиеся при фотоэффекте быстрые электроны вызывают сильную ионизацию в атомах поглощающего вещества.

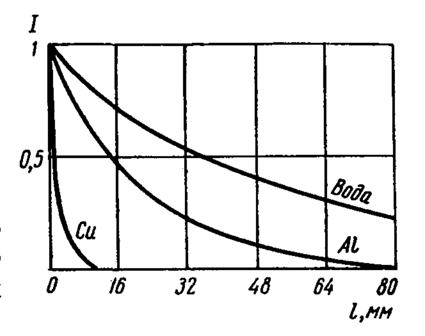


Рис. 127. Поглощение рентгеновского излучения в различных веществах. Длина волны излучения $\lambda = 0{,}14$ Å.

по оси абсцисс — толщина поглощающего слоя — l, по оси ординат — интенсивность рентгеновского излучения — I в относит. ед.

Эффект Комптона. Комптон-эффект состоит в том, что энергия падающего γ-кванта $E_1 = h\nu_1$ распределяется между выбиваемым из атома электроном E_2 и вторичным γ-квантом, несущим энергию $E_3 = h\nu_3$ (рис. 129,*Б*). При этом образовавшийся быстрый электрон производит новую ионизацию, а вторичный γ-квант вступает во взаимодействие с веществом путем того же комптоновского рассеяния, или фотоэлектрического поглощения. Поглощение γ-квантов путем комптон-эффекта характерно для веществ, облучаемых γ-квантами с энергией от сотен *Кэв* до несколь-

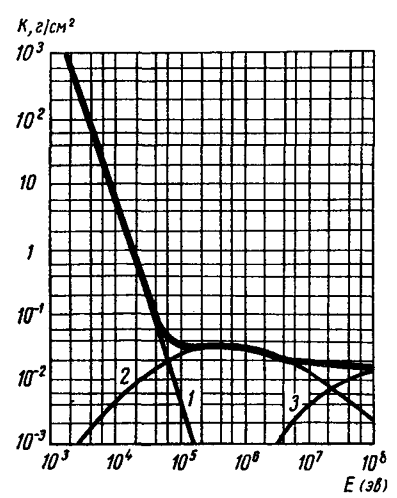


Рис. 128. Зависимость массового коэффициента поглощения воды от энергии рентгеновского или γ-излучения (жирная кривая). Отдельно показано поглощение за счет: *1* — фотоэффекта; *2* — комптоновского рассеяния; *3* — образования электронно-позитронных пар.

по оси абсцисс — энергия γ-излучения в *эв*, по оси ординат — массовый коэффициент поглощения в *г/см²*

ких *Мэв*. Как видно из рис. 127, область комптоновского рассеяния для воды, а также для биологических тканей, характеризуется относительным постоянством коэффициента поглощения.

Образование электронно-позитронных пар. При энергиях более 1,022 *Мэв* рентгеновские или γ-лучи вызывают появление в облучаемой среде двух частиц — электрона и позитрона (e^-, e^+), имеющих одинаковые массы и энергию E_2 и противоположные заряды (рис. 129, *В*). Образующиеся частицы вызывают ионизацию или возбуждение атомов поглощающего вещества. Позитрон, соединяясь с электроном, приводит к возникновению аннигиляционного γ-излучения, которое поглощается в веществе путем комптоновского рассеяния или фотоэлектрического эффекта. На кривой поглощения (см. рис. 128) этот эффект определяет поглощение в воде при энергиях, больших 10 *Мэв*.

Рис. 129. Схема взаимодействия γ-лучей с веществом: А — фотоэффект; *Б* — комптон-эффект; *В* — образование электронно-позитронных пар.
Объяснение см. в тексте

Рассмотренные механизмы поглощения рентгеновского и γ-излучения, показывают, что во всех этих случаях образуются быстрые электроны, которые в конечном счете и производят возбуждение и ионизацию атомов среды.

ИСТОЧНИКИ КОРПУСКУЛЯРНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Основным источником корпускулярных излучений являются радиоактивные изотопы.

Ядра атомов, принадлежащих одному и тому же элементу, всегда имеют одинаковое количество протонов, но могут содержать разное число нейтронов. Такие атомы будут иметь одинаковые химические свойства, но масса их будет различна. Атомы одного элемента, обладающие различной массой, называются **изотопами**. Ядра таких атомов несут одинаковый, характерный для данного элемента заряд.

Различают стабильные изотопы, т. е. такие изотопы, ядра которых устойчивы и в обычных условиях неизменяемы, и радиоактивные изотопы — такие изотопы, ядра которых распадаются, образуя при этом ядра атомов других элементов.

При радиоактивном распаде могут выделяться β-частицы и α-частицы.

Бета-частицами называются электроны и позитроны, излучением которых сопровождаются внутриядерные превращения.

Как и орбитальные электроны, β-частицы обладают отрицательным зарядом, равным одной элементарной единице, и массой, равной $\frac{1}{1840}$ массы атома водорода. Позитроны (β^+) отличаются тем, что несут положительный заряд.

При β-распаде атомного ядра испускается электрон (или позитрон) и антинейтрино (или, соответственно, нейтрино). Процесс можно описать следующим образом:

$$A_Z \longrightarrow A_{Z+1} + \bar{e} + \tilde{\nu},$$

или

$$A_Z \longrightarrow A_{Z-1} + e^+ + \nu,$$

где A — массовое число ядра,
Z — заряд ядра,
e^- (e^+) — электрон (позитрон),
ν ($\tilde{\nu}$) — нейтрино (антинейтрино).

Написанные уравнения характеризуют выполнение одного из основных законов ядерных превращений — закон сохранения заряда в процессе распада ядра.

Поскольку при β-распаде заряд ядра изменяется на единицу, то атом превращается в изотоп следующего в периодической системе химического элемента, когда испускается электрон, и в изотоп предшествующего элемента, когда испускается позитрон. Изменение заряда ядра Z означает, что внутри ядра происходят превращения нейтрона в протон (излучение электрона) и протона в нейтрон (излучение позитрона).

К β-распаду относятся и те случаи, когда ядро захватывает электрон из электронной оболочки, при котором протон превращается в нейтрон с испусканием нейтрино. Этот процесс можно описать так:

$$\bar{e} + p \longrightarrow n + \nu.$$

Наиболее вероятен захват электрона из K-оболочки (K-захват), реже с L-оболочки (L-захват). В противоположность β-распаду с испусканием β-частицы и нейтрино (или антинейтрино), при электронном захвате испускается только нейтрино. Регистрировать K-захват по единственно вылетающей из ядра частице — нейтрино очень трудно с экспериментальной точки зрения. Однако K-захват легко обнаружить по сопровождающему его рентгеновскому излучению. Вакантное место на орбите, образовавшееся вследствие K-захвата, вскоре заполняется электронами вышеле-

жащих орбит с излучением характеристических рентгеновских лучей.

Особенность β-распада состоит в том, что кинетические энергии электронов лежат в пределах от 0 до некоторой максимальной энергии E_{max}, которая определяется разностью масс ΔM начального и конечного ядра, т. е. та энергия, которая выделяется в процессе β-распада. Следовательно, имеется непрерывный энергетический спектр электронов, испускаемый при β-распаде изотопа легкого элемента (рис. 130).

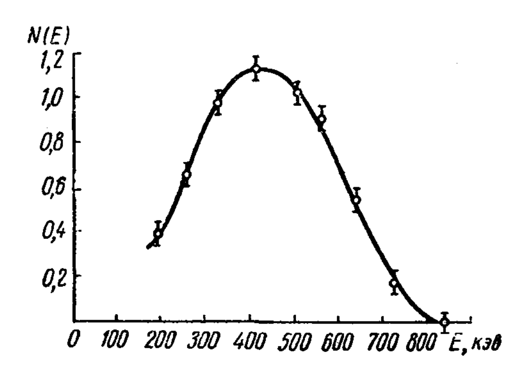


Рис. 130. Спектр β-излучения легкого элемента:

по оси абсцисс — кинетическая энергия β-частиц, по оси ординат — число электронов данной энергии (в относит. ед.)

Впервые объяснение β-распада было сделано В. Паули (W. Pauli), который в 1930 г. выдвинул гипотезу, согласно которой вместе с электроном испускается нейтральная частица — нейтрино. Экспериментальное подтверждение существования нейтрино было получено в 1957 г. При β-распаде полная энергия распределяется между электроном и нейтрино. Одним из основных свойств нейтрино является высокая проникающая способность. Так, например, нейтрино с энергией в несколько *Мэв* может иметь длину свободного пробега в несколько световых лет. Для электронов же, например, с энергией 2 *Мэв* длина свободного пробега в воде (или в биологической ткани) не превышает 1,2 *см*. Поскольку β-частицы, вылетающие из ядер атомов, обладают разной скоростью, длина пробега будет зависеть от энергии частиц. При выборе β-излучателей нужно иметь в виду, что наряду с β-частицами иногда наблюдается и γ-излучение, образующееся в тех случаях, когда дочерние ядра находятся в возбужденном состоянии. Поэтому в качестве чистых β-облучателей выбирают такие изотопы, которые при распаде не дают γ-излучения. К чистым β-излучателям, например, относятся P^{32}, S^{35}, C^{14}, Sr^{90} и др.

Энергия электронов, получаемых в ускорителе (например, в бетатроне), может быть значительно выше энергии β-частиц, вылетающих при радиоактивном распаде. Кроме того, пучки электронов, получаемые на ускорителе, обладают определенной энергией (т. е. моноэнергетичны).

Альфа-частицы. α-частицы — это один из видов ионизирующего излучения. По своей физической природе α-частицы являются ядрами атома гелия с атомным весом 4,003 (He^4). В результате

α-распада «материнское» ядро с зарядом Z и массовым числом M превращается в новое «дочернее» ядро с зарядом Z-2 и с массовым числом A-4. Например:

$$_{88}Ra^{226} \longrightarrow \alpha\text{-частица} + _{86}Rn^{222}.$$

В процессе α-распада различают две стадии: образование α-частицы из протонов и нейтронов (нуклонов) ядра и испускание α-частицы ядром. О первой стадии пока еще ничего неизвестно. Существенно, что вторая стадия определяет в основном время жизни α-активных ядер. Для удобства объяснения этой второй стадии изобразим ядро атома в виде потенциальной ямы (рис. 131). По оси ординат отложена энергия нуклонов в ядре (u), по оси абсцисс расстояние от центра ядра (r). Прохождение частицы сквозь потенциальный барьер, т. е. сквозь такую область пространства, где потенциальная энергия этой частицы больше ее полной энергии называют туннельным эффектом. Хотя полная энергия α-частицы (E) оказывается существенно меньше, чем максимальное значение потенциальной энергии, проникновение α-частицы сквозь потенциальный (кулоновский) барьер все-таки возможно. Так например, α-частица, вылетающая из ядра изотопа урана U^{238}, имеет энергию 4,2 *Мэв*, тогда как высота потенциального барьера для этой частицы равна 28,1 *Мэв*. Туннельный эффект сильно зависит от высоты и ширины потенциального барьера, что находит свое отражение в большом различии периодов полураспада α-радиоактивных изотопов (от $3 \cdot 10^{-7}$ *сек* для Po^{212} до $5 \cdot 10^{15}$ *лет* для Ce^{142}). Для α-частиц, испускаемых радиоактивным ядром, характерна почти строго определенная длина пробега в данном веществе, что свидетельствует о высокой степени однородности α-частиц по энергии. Вместе с тем при α-распаде испускается, как правило, целая серия α-частиц различной энергии, связанных с переходом из основного состояния материнского ядра в основное или в одно из возбужденных состояний дочернего ядра.

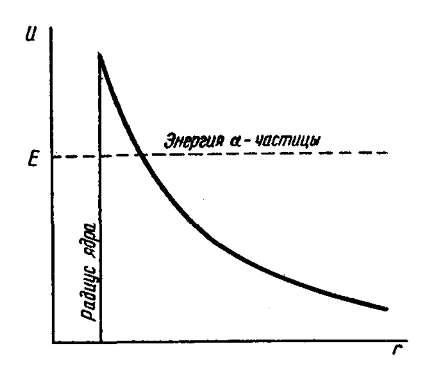


Рис. 131. Схематическое изображение «потенциальной ямы». Объяснение см. в тексте

Энергия α-частиц, испускаемых в ядерных реакциях, не отличается от энергии частиц, испускаемых естественными радиоактивными элементами, и лежит в пределах 4—9 *Мэв*. С помощью ускорителя можно получить α-частицы с энергией порядка сотен *Мэв*. α-частицы можно получать искусственно при двукратной ионизации атомов гелия и последующем ускорении на ускорителе.

Использование α-частиц в радиобиологических исследованиях ограничено из-за незначительной проникающей способности α-частиц (см. табл. 16).

α-частицы обладают исключительно большой ионизирующей способностью, благодаря их относительно большой массе и двойному заряду. Большая плотность ионизации, достигающая 3000—4500 ионов на микрон ткани, вызывает появление весьма плотных треков. По мере замедления движения частицы линейные потери энергии (поглощение энергии на единицу пути) возрастает вплоть до конца трека (рис. 132). Величина линейной потери энергии пропорциональна квадрату заряда ионизирующей частицы и снижается с ростом скорости частицы. Например, для электронов и α-частиц с одинаковой энергией она будет иметь различные значения. Для быстрых электронов наибольшая часть ионизаций и возбуждений будет совершаться в треках δ-лучей (вторичные электроны), где локальное значение линейной потери энергии значительно выше средней величины. Для α-частиц значительная часть эффекта также осуществляется в треках δ-лучей, но в этом случае линейные потери энергии оказываются гораздо ниже средней величины. δ-электроны составляют около 20% общего количества ионизаций и возбуждений, вызываемых α-частицами.

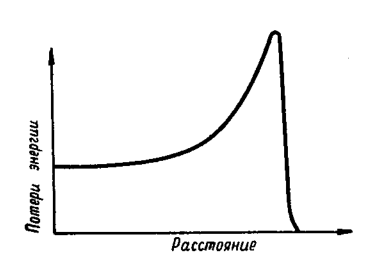


Рис. 132. Изменение линейной плотности ионизации при прохождении α-частиц через вещество:

по оси абсцисс — длина пробега α-частиц (в условн. ед.), по оси ординат — линейная плотность ионизации (в условн. ед.)

Протоны и дейтроны. Протоны представляют собой ядра легкого, а дейтроны тяжелого водорода (дейтерия) с единичным положительным зарядом. Масса протона почти в четыре раза, а масса дейтрона в два раза меньше массы α-частицы. Протоны и дейтроны могут выбрасываться из атомных ядер при некоторых ядерных реакциях. Например, при бомбардировке α-частицами ядер Ni^{60} среди других реакций возможна реакция с излучением протона:

$$Ni^{60} + \alpha \longrightarrow Zn^{64*} \longrightarrow \begin{cases} Zn^{63} + n \\ Zn^{62} + 2n \\ Cu^{62} + p + n \end{cases}$$

Однако трудность получения чистого протонного излучения и сравнительно низкая энергия протонов, получаемых в результате ядерных реакций, исключает возможность применения ядерных реакций как источников протонов. Используемые в настоящее время установки позволяют получать практически моноэнергетические потоки многих тяжелых ионизирующих частиц. Предварительно лишенный одного или нескольких электронов атом

становится ионом и его можно ускорять в соответствующих установках до больших скоростей. Так, протоны и дейтроны можно разгонять до больших скоростей в циклотронах, синхрофазотронах и других ускорителях ядерных частиц. Протоны, обладающие огромной энергией, попадают на Землю в составе космических лучей из мирового пространства. Во внутреннем радиационном поясе Земли (600—1000 *км*) бóльшую часть всех частиц составляют протоны. Радиоактивный углерод (C^{14}), образующийся в атмосфере, обязан своим появлением протонам, которые взаимодействуют с ядрами углерода. Действие тяжелых частиц на живые организмы изучено еще недостаточно.

В табл. 17 даны значения длин пробегов протонов с разной энергией в различных средах.

Таблица 16

Длина пробега α-частиц в различных материалах в зависимости от энергии

Энергия частиц	Пробеги α-частиц		
Мэв	воздух, *см*	ткань, *мк*	алюминий, *мк*
4	2,5	31	16
4,5	3,0	37	20
5	3,5	43	23
5,5	4,0	49	26
6	4,6	56	30
6,5	5,2	64	34
7	5,9	72	39
7,5	6,6	81	43
8	7,4	91	48
8,5	8,1	100	53
9	8,9	110	58
9,5	9,8	120	64
10	10,6	130	69

Таблица 17

Длина пробега протонов с различной энергией в различных средах

Энергия частиц, *Мэв*	Пробег протонов	
	воздух, *м*	алюминий, *мг/см*^{2}
1		3,45
2		10,8
5		50
10		170
15	2,4	340
100	71	
500	1100	
1000	3000	400

Нейтроны. Нейтроном называется электрически нейтральная ядерная частица с массой, близкой к массе протона. Нейтрон, как и протон, является составной частью ядра. Между свойствами нейтрона и протона существует очень большое сходство; они имеют почти одинаковые массы и способны к взаимопревращениям (например, при β-распаде). Это сходство позволяет их рассматривать как два состояния единой частицы — нуклона, различающееся только наличием или отсутствием электрического заряда. Однако аналогия в поведении нейтронов и протонов не проявляется при взаимодействии нуклонов с веществом. Для протонов главными процессами являются ионизация и возбуждение атомов среды, для нейтронов — непосредственное взаимодействие с ядрами благодаря ядерным силам. Каждый нейтрон в конечном счете поглощается ядром, вызывая ту или иную ядерную реакцию, т. е. нейтроны сами не приводят к ионизации, однако они выбивают протоны из ядра атома поглощающего вещества. Таким образом, биологическое действие нейтронов в основном почти целиком сводится к действию протонов.

Имеется ряд источников нейтронов, которые можно объединить в три группы. Первая группа включает источники нейтронов, которые получаются в результате взаимодействия α-частиц или γ-лучей, испускаемых естественно-радиоактивными веществами (Ra, Po), с ядрами легких элементов (Be, Li, B). Например:

$$_4Be^9 + {}_2He^4 \longrightarrow {}_6C^{12} + {}_0n^1$$

Образующиеся при этом нейтроны движутся с огромными скоростями и несут энергию в несколько *Мэв*. Такие нейтроны получили название быстрых нейтронов. При взаимодействии с веществом нейтроны могут терять свою энергию.

Нейтроны с энергией меньше, чем 10 *Кэв* называются медленными нейтронами. Когда скорость движения нейтронов падает до скорости теплового движения молекул (2200 *м/сек*), а энергия становится равной 0,025 *эв*, такие нейтроны называют тепловыми нейтронами. Медленные и тепловые нейтроны не выбивают протоны, а захватываются ядрами атомов, через которые они проходят. При этом возникает сильно ионизирующее γ-излучение. В живых тканях, облучаемых нейтронами, наиболее вероятны такие реакции с ядрами азота. Ядро азота захватывает нейтрон и испускает протон, превращаясь в радиоактивный углерод:

$$_7N^{14} + {}_0n^1 \longrightarrow {}_6C^{14} + {}_1H^1$$

Вероятность этого процесса растет с уменьшением энергии нейтрона. В тканях также имеет место захват нейтрона ядром водорода с образованием дейтрона:

$$_0n^1 + {}_1H^1 \longrightarrow {}_1H^2 + \gamma$$

Ко второй группе относятся методы получения нейтронов при помощи ускорителей заряженных частиц. При бомбардировке α-частицами, протонами, дейтронами мишеней из различных элементов можно получать нейтроны с энергиями от 1 до 20 *Мэв*. Большая вероятность реакции и хорошая монохроматичность испускаемых нейтронов делает этот метод важным источником нейтронов.

К третьей группе источников нейтронов относятся ядерные реакторы, наиболее мощный источник нейтронов, намного превосходящий по интенсивности все известные до сих пор источники. Наряду с другими характеристиками ядерного реактора как источника нейтронов важными характеристиками являются энергетический спектр нейтронов, величина потока нейтронов и технические возможности использования нейтронного излучения либо путем помещения образцов внутрь реактора, либо путем вывода из реактора пучков нейтронов.

ОСНОВНЫЕ ДОЗИМЕТРИЧЕСКИЕ ВЕЛИЧИНЫ И ЕДИНИЦЫ

За единицу дозы рентгеновского и γ-излучения принимается *рентген* (*р*).

Рентген — доза рентгеновского или гамма-излучения в воздухе, при которой сопряженная корпускулярная эмиссия на 0,001293 *г* воздуха производит в воздухе ионы, несущие заряд в одну электростатическую величину количества электричества каждого знака. 0,001293 *г* — это масса одного кубического сантиметра воздуха при температуре, равной 0° С и при давлении в 760 *мм рт. ст.*

Поскольку величина элементарного заряда, выраженная в электростатических единицах, равна $4{,}8 \cdot 10^{-10}$ СГСЕ, можно рассчитать, что один рентген образует в 1 *см*^{3} воздуха $2{,}08 \cdot 10^9$ пар ионов, а в 1 *г* воздуха — $1{,}61 \cdot 10^{12}$ пар ионов. Зная, что на образование одной пары ионов затрачивается в среднем 34 *эв*, а 1 *эв* соответствует $1{,}6 \cdot 10^{-12}$ *эрг*, можно также рассчитать, что в 1 *г* воздуха при дозе в 1 *р* поглощается 84 *эрг*.

Для измерения дозы, создаваемой корпускулярными излучениями, применяется единица физический эквивалент рентгена (*фэр*). *Фэр* (*гер*) — доза любого ионизирующего излучения, при котором в 1 *г* вещества поглощается 84 *эрг* — столько же, сколько в 1 *г* воздуха при 1 *р* рентгеновского или гамма-излучения.

В настоящее время более широко применяется единица поглощенной дозы — *рад*. Эта единица определяется как поглощенная доза любого ионизирующего излучения, равная 100 *эрг* на 1 *г* облучаемой среды.

Рад — универсальная единица, пригодная для всех видов излучения и для любой облучаемой среды. Однако, *рад*, так же как

р и *фэр*, не может быть использован непосредственно для определения величины биологического эффекта облучения.

Уже сравнительно давно было обращено внимание на то, что рассмотренные выше различные виды ионизирующего излучения в одной и той же дозе производят различный биологический эффект. Различная биологическая эффективность разных видов излучения определяется пространственным распределением ионов и величиной линейной потери энергии. Ионизирующие излучения с большой линейной потерей энергии обладают большей биологической эффективностью. Для сравнения различных видов излучения была необходима какая-то единая мера. С этой целью в дозиметрию были введены единицы: биологический эквивалент рентгена (*бер*) и относительная биологическая эффективность (*ОБЭ*).

Бэр (*rem*) — это количество энергии любого вида ионизирующего излучения, поглощенного в биологической ткани, биологическое действие которого эквивалентно действию 1 *р* рентгеновских или гамма-лучей. Поскольку для различных видов излучения биологический эквивалент рентгена различен, понадобилось и введение понятия относительной биологической эффективности.

На основании экспериментальных и клинических данных Международная комиссия по защите от излучений выпустила в 1955 г. рекомендации, в которых указывается на необходимость определения величины биологической эффективности в зависимости от величины удельной плотности ионизации в ткани живого объекта. За единицу была предложена биологическая эффективность излучения, вызывающая среднюю удельную ионизацию, равную 100 пар ионов на 1 *мк* пути в воде. Такую ионизацию вызывают рентгеновские лучи с энергией 200 *кэв*. Коэффициент относительной биологической эффективности радиации, вызывающей подобную удельную ионизацию, приравнивается к единице. ОБЭ излучений, вызывающих меньшую плотность ионизации, также приравнивается к единице.

Коэффициент относительной биологической эффективности можно определить, как коэффициент пропорциональности между физической и биологической дозами излучения. Как было показано выше, одинаковым биологическим дозам могут соответствовать различные физические дозы, выраженные в *фэр* или *рад*.

$$D_{бэр} = D_{фэр} \cdot ОБЭ, \text{ или } D_{бэр} = D_{рад} \cdot ОБЭ.$$

В приведенной формуле дозы в *рад* и *фэр* могут быть взаимозаменяемы, потому что точно определить поглощенную дозу в живых тканях трудно и ошибки в 10—20% считаются допустимыми.

В табл. 18 приведены данные о биологической эффективности различных видов ионизирующей радиации и предельно допустимые дозы, выраженные в *бэр* и *рад*. Согласно опубликованным в 1961 г. санитарным правилам, предельно допустимой дозой при

Таблица 18

Вид излучения	ОБЭ	Предельно допустимая доза	
		рад/неделя	*бэр/неделя*
Гамма- и рентгеновы лучи . . .	1	0,1	0,1
Бета-частицы и электроны . . .	1	0,1	0,1
Альфа-частицы и протоны . . .	10	0,01	0,1
Тепловые нейтроны	3	0,033	0,1
Быстрые нейтроны (до 20 *Мэв*)	10	0,01	0,1
Многозарядные ионы и ядра отдачи	20	0,005	0,1

профессиональном облучении считается 0,1 *бэр* за рабочую (шестидневную) неделю, т. е. 0,017 *бэр* в сутки.

II. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Как указывалось выше, биологический эффект действия различных видов ионизирующей радиации неодинаков. Однако важно, что одни и те же дозы одного и того же вида радиации вызывают разный эффект при воздействии на разные биологические объекты. В большой степени этот эффект зависит и от условий облучения, поэтому в радиобиологических работах необходимо учитывать, на каких живых объектах или биологических системах проводилась работа, а также условия и способ облучения.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЙ С ВЕЩЕСТВОМ

Характерной особенностью взаимодействия ионизирующей радиации с веществом является тот факт, что действию излучения подвергаются все молекулы живого вещества. Наличие поражения будет зависеть от того, возникнут ли после облучения в живой ткани процессы, приводящие к повреждению ее или же произойдет рекомбинация первичных продуктов, в результате чего все молекулы вернутся к своему исходному состоянию. Количество поглощаемой энергии, вызывающей эффект поражения, по своему тепловому эквиваленту невелико. Например, при облучении живой ткани дозой в 1000 *р* поглощается всего 84 000 *эрг*, что соответствует 0,002 калорий на 1 *г* ткани. Биологический же эффект такой дозы очень велик; например эта доза является абсолютно смертель-

ной для ряда млекопитающих животных. Высокая биологическая эффективность ионизирующей радиации привела некоторых исследователей к предположению о наличии каких-то усиливающих механизмов — физических, химических или биологических. Таким образом, оценивая особенности действия ионизирующей радиации на живой объект, необходимо подчеркнуть ее необычайную биологическую эффективность и способность воздействия на все молекулы живого вещества (особенно для глубоко проникающих видов излучения).

При поглощении энергии заряженных частиц и квантов электромагнитных излучений молекулами, в том числе и молекулами живого вещества, происходит возбуждение атомов и молекул и образование ионов (см. стр. 381). Кроме того, образуются свободные радикалы и перекиси. Все эти продукты первичных реакций взаимодействия радиации с веществом обладают высокой химической активностью и время существования их невелико (от 10^{-6} до 10^{-12} *сек*). Таким образом, в результате поглощения энергии ионизирующей радиации происходит активация молекул живого субстрата, возникают различные химические процессы. При этом возможно образование центров, обеспечивающих последующее развитие сложных химических реакций. Часть возбужденных и ионизированных атомов, молекул и радикалов может рекомбинировать, т. е. возвращаться к исходному состоянию. При этом может происходить переход поглощенной энергии в тепловую. Возможно и испускание лучистой энергии. Таким образом, вся поглощенная энергия переходит либо в химическую потенциальную энергию, либо в тепловую, либо в энергию излучения. Возбуждение атомов и молекул, образование ионов и свободных радикалов относят к первичным процессам лучевого поражения. Некоторые авторы (Б. Н. Тарусов) к первичным процессам также относят и процесс образования высокоактивных перекисей.

В настоящее время первичным процессам лучевого поражения придают очень большое значение, так как знание их помогло бы выяснению механизма действия ионизирующей радиации, что способствовало бы выработке средств защиты от лучевого поражения. Итак, *поглощение молекулами живой материи энергии ионизирующей радиации приводит к возникновению в ней высокоактивных продуктов, способных инициировать ряд химических и биохимических процессов в любых тканях живого организма.* Какие же изменения могут происходить при этом в ткани.

Радиолиз воды. В связи с тем, что в живом организме имеется большое количество воды (от 60 до 90%), ряд исследователей придают большое значение процессам радиолиза воды, содержащейся в организме. При действии ионизирующей радиации на воду, находящуюся в живой ткани, в ней так же, как и в обыкновенной воде, будут образовываться ионизированные и возбужденные молекулы и ионы.

Например, возможны следующие процессы:

$$H_2O \rightsquigarrow H_2O^*$$
$$H_2O \rightsquigarrow H_2O^+ + e^-$$

Положительный ион диссоциирует и образует радикал гидроксила $OH^\cdot$ и ион водорода H^+. По данным В. Л. Тальрозе, свободные радикалы могут получаться при взаимодействии положительно заряженных ионов с молекулами субстрата, т. е. возможны реакции

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^\cdot$$

Возникающие при действии ионизирующей радиации электроны, соединяясь с нейтральными молекулами воды, образуют отрицательно заряженный ион воды $H_2O + e^- \rightarrow H_2O^-$.

Последующая диссоциация приводит к образованию свободного атома водорода и иона гидроксила

$$H_2O^- \rightarrow OH^- + H^\cdot$$

Радикалы гидроксила и атома водорода могут также возникать и при действии радиации на ионы водорода и гидроксила, обычно присутствующие в воде.

$$OH^- \rightsquigarrow OH^\cdot + e$$
$$H^+ + e^- \rightarrow H^\cdot$$

Радикалы, образующиеся при возбуждении молекул воды, обычно располагаются вдоль трека, пространственно не разъединены и быстро рекомбинируют. При ионизации же образующиеся электроны выбрасываются на сравнительно большие расстояния, более чем на диаметр 100 молекул, поэтому ион гидроксила и атом водорода могут возникать на весьма далеком расстоянии от трека. Так, радикал гидроксила может образовываться на расстоянии до $8 \cdot 10^{-4}$ микрон, атом водорода — на расстоянии до $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ микрон. При взаимодействии двух гидроксилов возможно образование H_2O_2, однако эта реакция в бескислородной среде требует довольно больших энергий активации. В присутствии кислорода перекись водорода образуется из гидроперекиси водорода, которая также образуется в воде в присутствии кислорода.

$$H^\cdot + O_2 \rightarrow HO_2^\cdot.$$
$$2HO_2^\cdot \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

или

$$HO_2^\cdot + H^\cdot \rightarrow H_2O_2$$

Помимо рассмотренных нами путей возникновения продуктов радиолиза воды возможны и другие пути взаимодействия первич-

ных продуктов радиолиза. Например, возможно образование также высших перекисей H_2O_4 и т. д.

Таким образом, *при действии ионизирующей радиации на воду, содержащуюся в живом организме, в присутствии кислорода могут возникать положительные и отрицательные ионы воды, ион водорода и гидроксила, радикалы* OH, H и HO_2, а *также перекиси* H_2O_2 и H_2O_4 и т. д. Полученные в воде активные продукты радиолиза воды могут вступать в реакцию с органическими молекулами живой ткани. Например, они могут приводить к образованию органических радикалов, вступать в реакции с уже имеющимися свободными органическими радикалами, ионами и перекисями и являться центрами развития сложных биохимических реакций. *Продукты радиолиза воды при взаимодействии с активными органическими молекулами могут вызывать образование центра цепных реакций, т. е. являться инициаторами цепных процессов в живой ткани при действии на нее ионизирующей радиации.*

Поглощение энергии органическими молекулами. Энергия ионизирующей радиации может и непосредственно поглощаться органическими молекулами живой ткани. При этом также может происходить возбуждение молекул, ионизация их, образование свободных ионов и радикалов, возникновение органических гидроперекисей и перекисей. Например, возможно следующее развитие процессов в органическом субстрате RH.

$$RH \rightsquigarrow RH^+ \rightarrow R^\cdot + H^+$$
$$RH \rightsquigarrow RH^* \rightarrow R^\cdot + H^\cdot$$

В присутствии кислорода образуются перекисные радикалы RO_2, которые также могут вступать в реакции с исходным субстратом RH

$$RO_2^\cdot + RH \rightarrow ROOH + R^\cdot$$

В результате реакций перекисного радикала могут образовываться также и алкилперекиси R_1OOR_2.

Получен ряд экспериментальных данных, указывающих на образование в липидах, нуклеиновых кислотах, пирамидиновых основаниях большого количества перекисных радикалов и перекисей. Образовавшиеся в органическом субстрате радикалы и перекиси обладают большой энергией и могут инициировать в живой ткани цепные процессы. Например, возможно зарождение и развитие цепи по следующей схеме. Образовавшийся радикал взаимо-

действует с кислородом:

$$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow RO_2^{\cdot}$$

$$RO_2^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$$

$$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow RO_2^{\cdot}$$

$$ROOH \rightarrow RO^{\cdot} + OH^{\cdot}$$

Возможны и другие схемы возникновения цепных процессов в живой ткани при поглощении энергии ионизирующей радиации органическими молекулами. При поглощении физической энергии и размене физической энергии на химическую возникают активные химические продукты, способные вступать в реакцию со сложными биохимическими системами живого организма. В результате поглощения энергии ионизирующей радиации в сложных биохимических системах — белках, жирах, углеводородах — возникает ряд изменений, приводящих к нарушению структуры клетки и к возникновению необычных для нормального организма биохимических реакций, происходит нарушение нормального метаболизма клеток. Возникают так называемые вторичные биохимические процессы, изучение которых составляет предмет специальной дисциплины — радиационной биохимии.

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ

Первичные физико-химические и вторичные биохимические процессы приводят к нарушению нормальной функции организма и к возникновению лучевого поражения.

Существует ряд гипотез — теорий, пытающихся объяснить механизм лучевого поражения. Однако для того чтобы лучше разобраться в справедливости их, необходимо знание основных особенностей, закономерностей лучевого поражения, так как та гипотеза, которая может их объяснить, может иметь право на всеобщее признание. Поэтому коротко остановимся на основных закономерностях лучевого поражения живого объекта.

Биологический эффект действия ионизирующей радиации в основном зависит от дозы облучения. Очень большие дозы, порядка сотен тысяч рентген, вызывают смерть под лучом. Например, при облучении мыши дозой 100 000 *р* она умирает через 1—2 часа. Несколько меньшие, но все же довольно большие дозы — порядка сотен и тысяч рентген (для каждого типа животных дозы различны) вызывают лучевое заболевание, приводящее к смерти через несколько дней. Обычно пользуются так называемыми абсолютно летальными дозами, когда погибает в определенный срок вся группа облученных особей. При меньших дозах, как например, полу-

летальных, когда погибает половина облученных животных, у выживших также наступает лучевое заболевание, однако они выздоравливают. И, наконец, при длительном многократном применении очень малых доз возникает хроническая лучевая болезнь.

При однократном облучении малыми дозами лучевое заболевание не наступает, однако может возникнуть ряд нарушений обменных процессов, а также нарушение нормального функционирования ряда физиологических систем. Например, дозы порядка десятка рентген вызывают нарушение нормальной условнорефлекторной деятельности высших животных, оказывают влияние на клеточное деление и на передачу наследственных признаков.

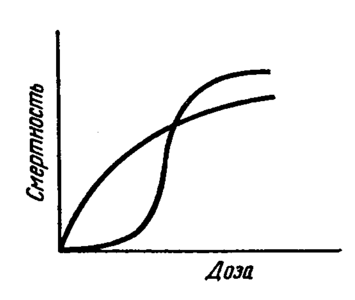


Рис. 133. Зависимость смертности организмов от дозы облучения

В настоящее время имеется очень много работ, в которых исследовано влияние ионизирующих излучений на самые разнообразные живые объекты системы и функции животных организмов. Изучалось влияние радиации на вирусы, фаги, одноклеточные простейшие, на бактерии, низшие и высшие растения и почти на всех представителей животного мира.

Количественные закономерности. При изучении количественной зависимости летального эффекта от величины дозы прибегают к построению графика этой зависимости и находят соответствующее математическое выражение.

При графическом изображении на оси абсцисс откладывают величину дозы или ее логарифм, на оси ординат — процент выживших или умерших животных, и в зависимости от этого получают кривые выживания или смертности (рис. 133). Для выживания одних живых объектов получается экспоненциальная зависимость, для других — S-образная. Такие кривые были получены для бактерий, дрожжей, простейших, растений и животных.

Распределение смертности особей в группе подчиняется известному из теории вероятности закону Пуассона. Пусть к началу облучения имеется Z клеток. Вероятность поражения клетки при элементарном увеличении дозы dD пропорциональна этому dD и равна VdD, где V — коэффициент пропорциональности. При действии ионизирующей радиации в клетках возникают определенные процессы, так называемые решающие события, которые определяют ее поражение. Если для того чтобы клетка погибла, требуется возникновение в ней n решающих событий, то количество клеток, выживающих при получении дозы D, будет равно:

$$Ze^{-VD}\left[1+\frac{VD}{1}+\frac{V^2D^2}{1\cdot 2}+\ldots+\frac{V^{n-1}D^{n-1}}{(n-1)!}\right].$$

Количество погибших клеток будет равно

$$1-Ze^{-VD}\left[1+\frac{VD}{1}+\frac{V^2D^2}{1\cdot 2}+\dots\frac{V^{n-1}D^{n-1}}{(n-1)!}\right].$$

На рис. 134 представлено распределение смертности в зависимости от дозы согласно закону Пуассона. На оси абсцисс отложена доза, на оси ординат — смертность в %. Сплошная кривая это количество погибших только от этой дозы, пунктирная — кривая всех погибших в данной дозе и погибших ранее, до данной дозы. Формулу Пуассона иногда записывают в следующем виде:

$$\frac{y}{y_0}=1-e^{-VD}\left[1+VD+\frac{V^2D^2}{2!}+\dots+\frac{(VD)^{n-1}}{(n-1)!}\right],$$

где $\frac{y}{y_0}$ — это отношение погибших клеток ко всем клеткам.

В том случае, когда дозная кривая является экспонентной, это уравнение принимает вид:

$$\frac{y}{y_0}=1-e^{-VD}.$$

S-образные кривые описываются уравнениями:

$$\frac{y}{y_0}=1-e^{-VD}[1+VD],$$

$$\frac{y}{y_0}=1-e^{-VD}\left[1+VD+\frac{VD^2}{2}\right] \text{ и т. д.}$$

Точка пересечения двух кривых (сплошной и пунктирной на рис. 134) соответствует дозе, при которой погибают 50% особей и обозначается обычно $D_{1/2}$. Доза, при которой погибает 50% облученных живых объектов, называется полулетальной. Эта доза является наиболее достоверной и обычно используется для определения чувствительности организмов к облучению.

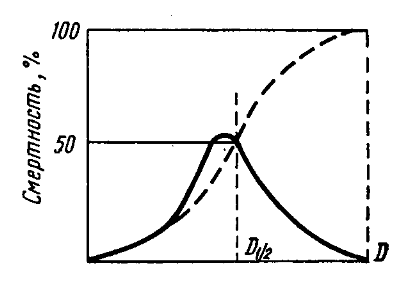


Рис. 134. Кривая поражения: по оси абсцисс — величина дозы, $D_{1/2}$ — полулетальная доза; D — летальная доза; по оси ординат смертность

Радиочувствительность организмов. Доза, вызывающая 50%-ную гибель, для различных организмов различна, что указывает на их различную радиочувствительность, или радиорезистентность. При сравнении радиорезистентности по величине LD_{50} необходимо учитывать время, за которое производят наблюдения за смертью подопытных объектов. Для животных обычно принимают время, равное 30 дням — $LD_{50/30}$. В табл. 19 представлены величины $LD_{50/30}$ для ряда живых организмов.

Таблица 19

Организм	Тип излучения	Величина $LD_{50/30}$, rem
Морская свинка	Рентгеновские лучи	250 (175—400)
Свинья	» »	350—400
Собака	» »	335
Обезьяна	» »	500
Человек	» »	600—700
Мышь	» »	550—665
Крыса	» »	665 (590—970)
Золотая рыбка	» »	670
Карась	» »	1800
Лягушка	» »	700
Тритон	» »	3000
Змея	» »	8000—20 000
Черепаха	» »	1500

Из позвоночных животных наиболее радиочувствительны млекопитающие. Их радиочувствительность выше радиочувствительности птиц, рыб, земноводных и пресмыкающихся. Довольно большой радиорезистентностью обладают насекомые. Например, доза в 4000 *р* γ-излучения не убивает взрослых особей дрозофилы, а лишь стерилизует их. Считается, что дозы излучения, вызывающие смерть насекомых, в 100 и более раз больше соответствующих доз для млекопитающих. Большая радиорезистентность была обнаружена и для одноклеточных организмов. Например, для дрожжей LD_{50} равна 30 000 *р*, для амебы —700 000 *р*, для *B. mesentericus* — 150 000 *р*, для парамеций — 300 000 *р* и т. д. Сравнение радиочувствительности разных одноклеточных живых объектов часто затруднено, так как время, за которое производили наблюдения за смертностью, было очень мало.

Радиочувствительность растений варьирует в весьма широких пределах — LD_{50} от 2000 до 64 000 *р* и более. Очень большая радиочувствительность установлена только для растущих растительных тканей — их делящихся клеток. Например, большой радиочувствительностью обладают растущие корни лука, конских бобов, пыльца традесканции.

Таким образом, можно отметить весьма различную чувствительность разных представителей растительного и животного мира, начиная от весьма высокой чувствительности к облучению, как у грибка *Phycomices*, и кончая бактериями вида *Pseudomonus*. У первого из них наблюдается замедление роста уже при дозе 0,01 *р*, последние же живут в воде, окружающей атомный реактор (США), где они получают за 8 *ч* дозу, равную 10 000 000 *р*. В настоящее время имеется довольно большое количество работ по радиочувствительности живых организмов, на основании которых мож-

но судить о величине доз, повреждающих организм. Однако иногда это сравнение затруднено тем, что летальный исход наблюдался за различные отрезки времени после облучения.

Помимо различной видовой чувствительности установлена разница в радиорезистентности между различными особями (в некоторых пределах дозы) одного и того же вида — индивидуальная радиочувствительность, зависимость ее от возраста, пола и т. д. Неодинакова радиочувствительность у различных животных и растительных тканей, различных клеток и различных частей клетки. Например, наиболее радиочувствительны половые клетки, форменные элементы крови, лимфоциты и т. д. Наименее чувствительны мышечная ткань, опорные ткани, хрящевая ткань и т. д.

Основные выводы о чувствительности различных тканей обычно производили на основании морфологических изменений. Однако это не всегда соответствовало радиочувствительности физиологической системы, т. е. началу нарушения физиологических функций. Например, по морфологическим изменениям нервная ткань является сравнительно устойчивой к облучению. Однако облучение в небольшой дозе животного (порядка десятка рентген) вызывает нарушение условнорефлекторной деятельности его. Изменяется радиочувствительность и при изменении физиологического состояния клеток. Например, установлена большая чувствительность к облучению делящихся клеток, причем эта чувствительность будет различна даже в различных стадиях деления клетки. Причина различной радиочувствительности различных видов животных и растений, зависимость ее от условий существования и от физиологического состояния до сих пор еще недостаточно изучены.

Чем определяется различная чувствительность разных тканей и от чего зависит изменение радиочувствительности клетки при изменении ее физиологического состояния, также до сих пор окончательно не выяснено.

Существует ряд предположений о связи радиочувствительности с обменом, с особенностями химического состава тканей животных и растений, например, с наличием в них ферментов, количеством аминокислот, антиокислителей, других ингибиторов ряда химических реакций и т. д. Предполагают также, что радиочувствительность определяется физико-химическим состоянием структуры клетки и возможностью возникновения в ней химических процессов. Некоторые выводы о характере этих процессов можно сделать на основании изучения ряда закономерностей действия ионизирующей радиации.

Развитие лучевого поражения во времени. Для действия ионизирующей радиации характерно своеобразное изменение во времени признаков поражения. *Если живой объект не облучен очень большой дозой, вызывающей так называемую «смерть под лучом», то обычно процесс поражения имеет три фазы. Первая фаза назы-*

вается фазой первичных изменений, вторая — фазой мнимого благополучия или, как его называют иногда, инкубационного периода и третья фаза — фаза лучевого заболевания. Продолжительность этих фаз различна у различных объектов и для каждого объекта зависит от дозы. При малых дозах первая фаза, например, может даже отсутствовать. Для этой первой фазы характерны реакции, аналогичные реакциям возбуждения, сопровождающиеся изменением некоторых биохимических процессов и нарушением физиологических функций.

Затем наступает фаза мнимого благополучия, длительность которой у различных животных различна: для высших животных от 5—21 суток, у простейших — несколько часов или дней, у моллюсков — несколько месяцев и зависит от дозы облучения. В период мнимого благополучия почти все изменения, характерные для первой фазы, проходят, и в таких случаях отклонений от нормы у пораженных животных не наблюдается.

За второй фазой наступает третья фаза — фаза лучевого заболевания. При этом наступает быстрое нарастание физиологических и биохимических изменений, появляется ряд патологических явлений и начинает развиваться лучевое заболевание. Тяжесть этого заболевания находится в прямой зависимости от дозы облучения. При малых дозах животное выживает, при больших — наступает смерть.

Анализ кривых смертности при различных дозах воздействия в ряде работ показал, что *в области средних и малых доз имеется два пика смертности.* Такие два пика смертности были получены на дрожжах, гидрах, мышах. Наличие пиков смертности некоторыми авторами объясняется тем, что при *лучевом поражении в тканях живого организма возникают две реакции с различными механизмами, которые развиваются независимо одна от другой и каждая из которых может привести к гибели.* С возрастанием дозы возрастает количество особей, погибающих в первом максимуме. При очень больших дозах все особи погибают в первом максимуме и, следовательно, второй максимум отсутствует. С уменьшением дозы, наоборот, повышается количество особей, погибших во втором максимуме. Это указывает на то, что из двух развивающихся реакций первая развивается во времени быстрее и имеет малый индукционный период, а вторая реакция имеет большой индукционный период.

При более длительном исследовании гибели дрожжевых клеток во времени при изменении содержания кислорода удалось выявить еще третий пик гибели. В этих работах первый пик наблюдался в области наибольших доз, второй — при средних и третий — при малых дозах. На основании анализа кривых авторы этих работ пришли к выводу о возникновении в клетках облученных дрожжей трех независимых друг от друга реакций. Первая реакция — неокислительного типа, вторая и третья

реакции связаны с развитием окислительных реакций, так как они зависели от содержания кислорода в среде. Все три реакции, имеющие различный ионный выход и различные временные параметры, развиваются параллельно и вызывают в сложной биологической системе — в организме — лучевое поражение.

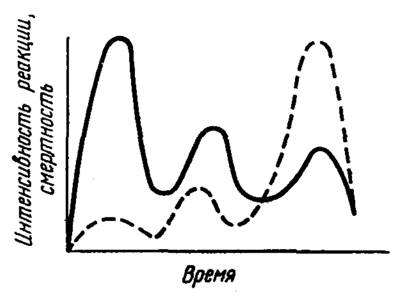


Рис. 135. Схема распределения гибели организмов во времени в зависимости от плотности ионизации: сплошная кривая — α-лучи, пунктирная кривая — γ-лучи

Вероятность того, что летальный эффект будет определяться одной из этих реакций, зависит, кроме дозы, и от плотности ионизации. При больших плотностях ионизации (при действии α-частиц, протонов и т. п.) наибольшее количество особей погибает в первом максимуме вследствие реакции неокислительного характера. Но одновременно при этом протекают и окислительные реакции, и определенная часть особей погибает во втором и третьем максимуме. При действии излучений, создающих менее плотную ионизацию (рентгеновские и γ-лучи, β-частицы), наибольшее количество особей погибает (в зависимости от дозы) во втором и третьем максимумах. В этом случае гибель клеток будет определять развитие реакций окислительного типа (рис. 135).

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ

На зависимость гибели различных организмов от дозы облучения оказывают влияние изменения ряда внешних условий, в которых происходит облучение. Известно, что при изменении состава питательной среды кривая гибели бактерий меняется, и вместо экспоненциальной становится S-образной. При изменении pH среды также меняется чувствительность клеток к облучению. Наиболее заметное влияние на развитие лучевого поражения оказывают изменения температуры и парциального давления кислорода.

Влияние температуры. Исследованиями на различных объектах установлено, что *изменение температуры во время облучения мало влияет на эффективность лучевого поражения*. Если облучение проводилось даже в атмосфере жидкого азота, температурный коэффициент не превышал 1,1—1,3.

Картина резко меняется, когда изменяют температуру, при которой содержится облученный объект после облучения. Эти исследования проводились на различных объектах. Были поставлены исследования по изучению влияния температуры на яйца

аскариды, икру лягушки, взрослых лягушек, новорожденных крысят, на семена и проростки растений, на дрожжи и т. д. *Поражения ионизирующей радиацией резко усиливаются при увеличении температуры после облучения. При содержании облученных животных после облучения в условиях пониженной температуры степень поражения уменьшается.*

При содержании животных при очень низкой температуре поражение может и не развиваться, но если их перевести в условия повышенной температуры, сразу начинается развитие лучевого заболевания. Например, увеличение температуры с 6° до 30° С вызывает увеличение поражения бактерий в четыре раза (A. Hollender), в опытах на лягушках температурный коэффициент равен 6 и т. д. Незначительное изменение величины поражения при изменении температуры во время облучения указывает на то, что в момент облучения в живом субстрате протекают процессы, аналогичные фотохимическим; увеличение же степени поражения при увеличении температуры после облучения, в свою очередь, указывает на возникновение в живом субстрате химических реакций.

Влияние кислорода. При изучении влияния различных внешних условий на эффективность действия ионизирующей радиации установлено большое влияние на развитие поражения присутствия кислорода. Уже сравнительно давно было показано, что снижение парциального давления кислорода во время облучения снижает радиочувствительность живого объекта. Это явление было установлено при изучении действия ионизирующей радиации с малой плотностью ионизации. *Явление снижения радиочувствительности к облучению при снижении парциального давления кислорода было названо кислородным эффектом.*

Кислородный эффект установлен в многочисленных работах с различными объектами: вирусами, бактериями, растениями и животными. Снижение давления кислорода снижало эффект облучения на 50%. При изучении выживаемости мышей было установлено (Stender a. Hornikewitsch) наличие пороговой концентрации кислорода, при которой появляется этот эффект. В этой работе было показано, что выживаемость увеличивается при снижении концентрации кислорода с 8 до 6%. При снижении же концентрации с 30 до 8% влияния кислорода обнаружено не было. Таким образом был установлен как бы нижний порог кислородного эффекта.

В дальнейшем был обнаружен верхний кислородный предел, т. е. показано увеличение выживаемости и при повышении парциального давления кислорода. Этот эффект был впервые установлен Калантаровым на дрожжах *Sacharomyces vini*. Он показал, что выживаемость дрожжей повышалась как при снижении давления кислорода ниже 100 *мм рт. ст.* так и при подъеме его выше 1 атмосферы.

Возникло предположение, что влияние кислорода связано с изменением дыхания и понижением обмена веществ. Однако специально поставленные опыты опровергли эту гипотезу. В этих опытах изучалось влияние давления кислорода на хромосомные аберрации облученных корешков конских бобов. При подавленном дыхании была получена кривая выживания, характерная для кислородного эффекта. Кроме того, кислородный эффект был получен как у аэробных, так и у анаэробных бактерий.

При объяснении кислородного эффекта прибегали к предположению, что изменение выживаемости, при уменьшении концентрации кислорода, связано с ослаблением интенсивности окислительных процессов, возникающих в тканях при действии ионизирующей радиации. Некоторые авторы придавали большое значение образующимся при действии радиации на воду радикалов HO_2, которые образуются в присутствии кислорода, а также изменению образования других радикалов и перекисей в водной фазе в присутствии кислорода. Однако экспериментально это положение не подтвердилось. В настоящее время предпринимаются попытки объяснить это явление с позиций теории цепных процессов (см. стр. 74). В последние годы было установлено, что изменение парциального давления кислорода после облучения также влияет на развитие лучевого поражения. Однако это «кислородное последействие» имеет другой механизм, чем кислородный эффект, и проявляется незначительно.

На основании изложенного материала можно сделать вывод, что *изменение внешних условий во время облучения (парциальное давление кислорода, солевой состав среды и т. п.) и после облучения (температура, состав среды) приводит к изменению эффективности лучевого поражения.*

Химическая защита. Степень лучевого поражения изменяется при введении до облучения ряда химических веществ в среду, где живет объект, или в организм человека. Это *снижение степени лучевого поражения, при введении ряда химических соединений, носит название химической защиты.* В настоящее время описано большое количество химических соединений, способных уменьшить лучевое поражение. Защитным действием обладают соединения, содержащие сульфгидрильные группы и серу. Например, цистеин, глутатион и другие препараты снижают смертность дрожжей, простейших, а также и высших животных.

Найдено защитное действие и других групп химических соединений, например аминов, сахаров, стеридов, хинонов, флавинов, некоторых антибиотиков и т. д.

В первое время химическую защиту пытались объяснить только наличием в защитных соединениях сульфгидрильных групп. Некоторые авторы считали, что первичный механизм действия ионизирующей радиации связан с инактивацией сульфгидрильных групп (имеющих важное значение в окислительных

ферментах) водными радикалами, возникающими при облучении. Однако эта точка зрения не оправдалась.

Затем высказывалось предположение, что все профилактические вещества связывают активные продукты радиолиза воды и тем самым осуществляют защиту. Возможно, что такой механизм защиты существует в тех случаях, когда активные продукты радиолиза действительно определяют поражение живого объекта.

В последующие годы было выдвинуто предположение, что основным свойством, характеризующим защитные вещества, является их антиокислительная способность. Почти все защитные вещества являются ингибиторами окислительных процессов. Они обладают восстановительными свойствами и способны тормозить окислительные реакции. Некоторые исследователи считают, что действие защитных веществ сводится к снижению концентрации кислорода, т. е. к созданию в тканях таких условий, какие способствуют проявлению рассмотренного выше кислородного эффекта. Одним из доказательств этому приводят факт, что при защите, достигаемой снижением кислорода, прибавление защитных веществ уже не оказывает существенного эффекта. Однако этот факт не может служить доказательством общности их механизмов, а скорее всего говорит о том, что при недостатке кислорода в живой ткани образуется меньше активных продуктов, которые инактивируют вещества химической защиты. Сложная окислительная реакция, возникающая в живом организме при действии излучений в присутствии кислорода, в данном случае отсутствует, и в субстрате не появляются вредные для организма соединения, с которыми реагируют защитные вещества. Отсутствие кислорода или введение антиокислителей приводит, по-видимому, к ингибированию одной и той же реакции.

При действии защитных веществ обнаружено, что они оказывают защиту, если вводятся непосредственно перед облучением. При введении же после облучения эти вещества практически не защищают организм; часть же из них, как, например, вещества, содержащие сульфгидрильную группу, усиливают радиационное поражение (введение цистеамина мышам, меркамина и цистеина крысам и т. д.).

При защите кислородом и при применении в качестве защитных веществ антиокислителей (при сравнительно высоких дозах) нельзя снизить эффект поражения до 100%. Это подтверждает положение о том, что помимо реакций окислительного типа в живом организме при облучении возникают также в первый момент реакции не окислительного характера.

В связи с тем, что многие защитные вещества являются восстановителями, были предприняты попытки установить связь между окислительно-восстановительным потенциалом различных химических веществ и их способностью к защите. Ряд попыток

окончился неудачей, так как исследования проводились с гомогенатами, в которых нарушено окислительно-восстановительное стационарное равновесие, присущее живой неповрежденной клетке. И лишь при измерении окислительно-восстановительного потенциала в условиях нормального стационарного равновесия в целом животном, удалось установить связь между окислительно-восстановительным потенциалом и способностью к защите некоторых защитных веществ. При этом выяснилось, что введение веществ, оказывающих защиту, и недостаток кислорода в ткани сдвигают потенциал в положительную сторону. При изучении защитного действия ингибиторов свободно-радикальных реакций было получено соответствие между антирадикальной активностью ингибиторов и их радиозащитным действием.

При изучении эффективности ряда защитных веществ всегда необходимо учитывать их растворимость и способность проникать в живую клетку. При изучении механизма действия защитных веществ необходимо также учитывать возможность воздействия их на различные физиологические функции организма. Такие воздействия могут приводить к изменению насыщения тканей кислородом, например, действие ряда веществ на дыхательный центр, в результате чего может измениться снабжение ткани кислородом. В последнее время ведутся интенсивные исследования комбинированного действия различных синтетических и природных защитных веществ.

Восстановление после лучевого поражения. Среди других особенностей лучевого поражения необходимо отметить способность облученных организмов к восстановлению. Уже давно было отмечено, что многократное облучение малыми дозами с определенными интервалами между облучением может привести к большому увеличению дозы, вызывающей летальный эффект. Так, при ежедневном облучении собак дозой в 10 *р* LD_{50} увеличивается до 1000 *р*, а для некоторых собак даже до 5000 *р*. Полулетальная доза для мыши не вызывает эффекта, если вторую ее половину дать через восемь дней, очевидно за этот промежуток времени происходит полное восстановление.

В специальных опытах выяснялась возможность восстановления. Мышей облучали рентгеновскими лучами и определяли LD_{50}. Три группы мышей облучали половиной полулетальной дозы. Далее проводили вторичное облучение мышей через 2, 10, 20 дней, определяя величину LD_{50} в этих условиях. Оказалось, что LD_{50} была наибольшей для группы животных, облученных вторично через 20 дней. С помощью статистических методов рассчитывалась степень восстановления, определялась величина чистого остаточного облучения и объем необратимых изменений.

В специальных исследованиях было показано, что для восстановления 50%-ного повреждения при рентгеновском облучении млекопитающих требуется более или менее постоянное время:

для мышей оно равно 7—4 дня, для крыс — 8—5, для обезьян — 4—8 дня.

При анализе процессов восстановления Блеер с сотрудниками (H. Blair) обнаружили, что объем необратимой фазы равен 10%. Однако не все исследователи согласны с наличием при поражении необратимых изменений. Некоторые считают, что их либо нет, либо они очень незначительны. Вопрос о возможности процессов восстановления после поражения имеет не только теоретическое, но и практическое значение. В настоящее время полагают, что необходимо различать следующие сферы развития процессов восстановления: 1) возможна нейтрализация первичных поражений на уровне молекул; рекомбинация всех образующихся в результате первичных реакций активных продуктов; 2) нейтрализация вторичных эффектов, синтез новых молекул вместо инактивированных. Эти два указанных механизма считают внутриклеточным восстановлением; 3) замещение в организме погибших при облучении клеток новыми клетками в результате деления неповрежденных клеток. При этом имеет значение включение компенсаторных механизмов, имеющих место в целом организме.

В радиобиологической литературе восстановлением называют также снижение поражаемости низших организмов (дрожжей, бактерий) в условиях опыта, при которых снижается обмен веществ за счет прекращения нормального питания или снижения температуры.

Применение термина «восстановление» в отношении подобных экспериментов вряд ли оправданно, хотя в настоящее время это широко распространено. Некоторые авторы (Тарусов) вообще возражают против применения термина «восстановление», так как считают, что этот термин свидетельствует о восстановлении каких-то разрушенных структур. По мнению Тарусова, во всех описанных выше случаях мы имеем дело лишь с торможением развития реакций, приводящих к лучевому поражению. В последние годы появился ряд новых гипотез, объясняющих эффект восстановления.

Отдаленные последствия лучевого поражения. К особенностям действия ионизирующей радиации необходимо отнести их хорошо известную способность вызывать отдаленные последствия, т. е. возникновение в облученных организмах нарушений по прошествии длительного времени после облучения. К таким отдаленным последствиям относят уменьшение продолжительности жизни, возникновение злокачественных образований, развитие лейкозов, появление катаракты и т. д.

При исследовании сокращения продолжительности жизни животных при облучении малыми дозами было, например, найдено, что у мелких грызунов продолжительность жизни сокращается на 10% после облучения дозой, равной $1/4LD_{50/30}$. В другой работе показано, что продолжительность жизни мышей

и крыс сокращается при однократном воздействии рентгеновских лучей на 2,5—5% на каждые 100 *р*. При этом имеет значение и мощность дозы. Изучался также процесс старения подопытных животных по изменению ряда признаков. Однако не удалось получить каких-либо четких данных. Этот вопрос еще нуждается в дополнительном изучении. Нет достоверных данных об изменении продолжительности жизни людей, работающих с ионизирующей радиацией.

Известно, что ионизирующие излучения обладают неспецифическим, но очень сильным канцерогенным действием. Это проявляется при довольно больших дозах облучения. Однако ионизирующая радиация может вызывать развитие злокачественных опухолей и при длительном облучении малыми дозами в отдаленные сроки после облучения. Эти выводы получены на основании специальных экспериментов на животных и при анализе профессиональных заболеваний людей, работа которых связана с облучением или попаданием внутрь организма радиоактивных изотопов.

Особенно часто ионизирующие излучения вызывают лейкозы, опухоли кроветворной ткани, щитовидной железы, печени, кожи и подкожной клетчатки. При действии ионизирующей радиации также наступает целый ряд отдаленных последствий, выражающихся в нарушении работы эндокринных желез, образование «лучевой» катаракты, поражение радужной оболочки глаза. Лучевая катаракта была получена у кроликов, морских свинок, мышей, крыс. Наблюдалась она и у человека.

Таким образом, *воздействие ионизирующей радиации на живой объект обладает рядом особенностей, отличающих это воздействие от воздействия других видов лучистой энергии.*

ГИПОТЕЗЫ, ОБЪЯСНЯЮЩИЕ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Для объяснения механизма действия ионизирующей радиации был создан ряд теорий, вернее, гипотез, которые пытаются объяснить механизм лучевого поражения. Причем только та теория может быть признана правильной, которая в состоянии объяснить все основные закономерности. В первую очередь необходимо объяснить необычно большую биологическую эффективность, т. е. наличие какого-то усиливающего механизма; объяснить количественную зависимость гибели от дозы; наличие инкубационного периода; действие кислорода; химических защитных веществ; явление восстановления и т. д.

Теория мишени. Одними из первых теорий, пытающихся объяснить, почему ничтожное по тепловому коэффициенту количество поглощенной энергии вызывает такой большой биологический эффект, были теория мишени и теория попаданий (J. Crow-

ther и др.).[1] Большое значение для подтверждения теории мишеней имеет проведенный рядом авторов количественный анализ кривых зависимости смертельного эффекта от дозы облучения. Согласно этой теории, в живой клетке имеется определенный чувствительный объем — мишень, попадание в который заряженной частицы или поглощение кванта электромагнитной энергии приводит к гибели клеток. Как мы указывали выше, для многих простейших организмов кривая— «доза — эффект» имеет экспоненциальный характер, т. е. смерть некоторых клеток может наступить при поглощении ничтожно малых количеств энергии — результате одного попадания в чувствительный объем. Если для гибели клеток необходимо два или несколько попаданий, то кривая «доза — эффект» имеет сигмоидную форму. Попадание в мишень подчинено закону вероятности и вычисляется при помощи уравнения Пуассона. Вычисленные согласно этому уравнению, кривые хорошо совпадают с кривыми, полученными в опыте. Это всегда использовалось сторонниками теории мишени, как доказательство справедливости этой теории. Однако некоторые особенности лучевого поражения, как например различная чувствительность животных к различным видам излучения, изменение радиочувствительности при изменении внешних условий и т. д., трудно объяснить при наличии одной чувствительной мишени. Поэтому пришли к представлению о различной величине мишени для различных излучений, о наличии нескольких мишеней и об их различной радиочувствительности. Из количественного анализа дозных кривых сторонники теории мишени определяли все упомянутые параметры мишени. Возникло специальное направление — количественная радиобиология, которая и занималась таким анализом.

Однако по мере накопления экспериментального материала по действию ионизирующей радиации появлялось все больше фактов, трудно объяснимых с позиции теории мишени. Например, исходя из теории мишени, следовало ожидать, что α-излучение будет иметь меньшую биологическую эффективность, чем β- и γ-излучение, особенно для случаев, когда дозная кривая экспоненциальна, т. е. когда гибель происходила от одного попадания. Однако при этом в большинстве случаев α-излучение оказалось более эффективным. Для того чтобы объяснить это явление с точки зрения теории мишени, необходимо допустить, что для различных излучений размеры мишени различны. Трудно объяснимо, с точки зрения теории мишени, изменение формы кривой гибели в зависимости от дозы и от условий содержания объекта.

Чувствительность к облучению зависит также от мощности дозы. Вообще типичные формы кривых четко получаются лишь

---

[1] При изложении мы не будем различать эти две теории (как делают их авторы), так как, с нашей точки зрения, они очень близки друг другу.

в определенном диапазоне доз. Например, для некоторых бактерий была получена экспоненциальная кривая гибели при действии больших доз и S-образная при облучении малыми дозами. Разная форма кривой гибели была получена у дрожжей при определении ее в разные сроки гибели после облучения. Все эти изменения формы кривых гибели трудно объяснимы с позиции теории мишени.

Сторонники теории мишени пытались связать чувствительный объем с какой-либо частью клетки, с ядром, ядрышком, геном. В первое время для ряда объектов получали совпадение величины чувствительного объема с величиной гена, но затем, по мере расширения исследований по генетике, вычисленный объем мишени в ряде случаев оказался больше площади, отводимой на гены. Например, для клеток культуры ткани объем вычисленной мишени равнялся $0{,}25^3$ *мк*, т. е. оказался приблизительно в 1000 раз больше объема, принятого для одного гена.

В подтверждение теории мишени часто приводились опыты, говорящие о большей радиочувствительности ядра по сравнению с чувствительностью протоплазмы. Однако в ряде опытов были получены данные, говорящие об одинаковой или даже большей чувствительности цитоплазмы. Например, при раздельном облучении ядра и протоплазмы яиц саламандры и лягушки удалось показать, что морфологические изменения происходят при облучении отдельных ядер дозами 10—15 *кр*. Такие же изменения наступали в ядре при облучении всей клетки меньшими дозами. Вообще при раздельном облучении ядра и протоплазмы и введении облученного ядра в необлученную протоплазму дозы, приводящие к поражению, почти одинаковы. В опытах на шелковичном черве было найдено, что при облучении только одних яиц и оплодотворении их необлученными сперматозоидами у потомства нарушались наследственные признаки сперматозоида. На амебах и водорослях так же была показана большая чувствительность протоплазмы. И лишь в некоторых опытах, например, на культуре ткани, и в опытах с яйцами некоторых насекомых, получены противоположные данные. Таким образом, можно считать, что в некоторых случаях основные процессы, определяющие радиационное поражение, происходят в ядре, а в других — в протоплазме.

Противоречит теории мишени и тот факт, что в ряде опытов получена отдаленная гибель облученных клеток после нескольких делений. Из теории мишени следует, что если повреждена мишень, а сторонники этой теории связывают ее с хромосомным аппаратом, то поврежден и хромосомный аппарат и клетка должна погибнуть, как только вступит в фазу деления. Между тем дрожжи могут гибнуть после 8 делений, инфузории — через 3—4 деления. Такая отдаленная гибель наблюдается после облучения сравнительно небольшими дозами, при больших же дозах клетки гибнут и без деления.

Гибель клеток после многократных делений трудно объяснить с позиции теории мишени. Очень трудно объяснить с позиции этой теории также наличие инкубационного периода при облучении, влияние температуры, защитное действие химических веществ, влияние кислорода на чувствительность к облучению, появление в ткани облученных животных токсических продуктов, наличие первичного поражения, вызванного радикалами и перекисями, и т. д. Трудно объяснимо также влияние ряда химических веществ (радиомиметических) на хромосомный аппарат клетки и т. д.

Одним из основных доказательств теории мишени обычно считают совпадение теоретических кривых с экспериментальными и возможность на основе количественных зависимостей между дозой и гибелью вычислять количество попаданий, величину чувствительного объема мишени и количество мишеней. Однако детальный анализ кривых поражения показал, что решение этой задачи при возможном изменении всех трех параметров является весьма неопределенным. Один из сторонников теории мишени Циммер показал возможные ошибки в трактовке кривых одного и многих попаданий.

Многие сторонники теории мишени старались модифицировать теорию, привлекали к объяснению механизма повреждения ионизирующей радиации возникновение в протоплазме химических продуктов, в частности, возникновение радикалов (C. Tobias, K. Zimmer), которые затем диффундируют к чувствительному объему — мишени, что и приводит к поражению. Однако все эти теории имеют много произвольных допущений, как-то: скорости диффузии радикалов, время жизни радикалов и т. д. В этих теориях химические реакции являются лишь предварительными реакциями, поражение определяется той же чувствительной мишенью. Эти модифицированные теории так же, как и теория мишени в чистом виде, являются формальными теориями. Таким образом, весь накопившийся экспериментальный материал по действию ионизирующей реакции на живой организм не может быть в настоящее время объяснен с точки зрения теории мишени. Даже такие сторонники ее, как Ли, считают, что теория мишени применима лучше всего для объяснения поражения хромосом, инактивации вирусов и генной мутации. Однако, как правильно отличают Бак и Александер (Z. Bacqa, P. Alexander), более тщательные исследования показали, что и это неверно. Например, при изучении нарушений процессов мутаций была показана зависимость эффекта от мощности дозы, наличия защитного действия химических веществ, зависимость поражения от кислорода — уменьшение поражения с увеличением линейной плотности энергии и т. д. Все эти явления, отмеченные при изучении влияния ионизирующей радиации на процессы мутации, также не могут быть объяснены с точки зрения теории мишени.

Теория непрямого действия. Наличие особенностей лучевого поражения, которые трудно объяснить с точки зрения теории мишени, привели ряд исследователей к убеждению, что под влиянием ионизирующей радиации в живом веществе возникают сложные химические процессы, приводящие в дальнейшем к лучевому поражению. В связи с этим возник ряд новых гипотез, пытающихся ответить на вопрос о механизме действия ионизирующей радиации. К таким теориям относится в первую очередь так называемая теория непрямого действия, выдвинутая Вейсом (J. Weiss) и подробно развитая Дейлом (W. Dale) и рядом других авторов.

Согласно этой теории, в водной фазе живого организма возникают химические продукты радиолиза воды: ионы, радикалы, перекиси, которые затем вступают во взаимодействие с органическими молекулами, вызывают их изменения. Такое предположение является вполне закономерным, так как в живых тканях содержится большое количество воды (от 60 до 90%). К тому же довольно хорошо было известно возникновение при действии радиации ионов и ряда радикалов в воде (OH, H, HO_2, H_2O и т. д.) и последующее образование гидроперекиси и перекиси. Сравнение величины повреждающих доз при облучении сухих объектов и увлажненных показало бо́льшую повреждаемость влажных. Например, при облучении сухого вируса мозаичной болезни табака он поражается дозами, в 100—1000 раз большими, чем при облучении его же в водном растворе. В подтверждение теории непрямого действия также приводят так называемый эффект разведения. Этот эффект заключается в том, что при одной и той же дозе облучения количество инактивированного вещества, в широком интервале разведений, не зависит от концентрации этого вещества в растворе. Например было показано, что при разведении фермента в 60 раз количество инактивированных молекул не меняется. Этот эффект разведения выявляется только в интервале средних концентраций, при увеличении концентраций выше 15% имеет уже значение и количество растворенного вещества. Эффект разведения обусловлен тем, что при не очень больших концентрациях растворенного в воде вещества количество продуктов радиолиза значительно больше количества этого вещества. Радиационный эффект будет определяться взаимодействием радикалов воды с молекулами растворимого вещества.

Дейл считает доказательством справедливости теории непрямого действия также и факт защиты от излучения химическими веществами. Согласно теории непрямого действия защищающее химическое вещество конкурирует со свободными радикалами воды, тем самым уменьшает их взаимодействие с растворенным веществом. Указывается также на значение величины pH раствора, оказывающего влияние на биологический эффект радиации. Теория непрямого действия может объяснить и ряд других

закономерностей действия ионизирующей радиации, как например, наличие инкубационного периода, зависимость его от температуры, влияние кислорода, явление защиты, восстановления и т. д. Возможно объяснение усиления эффекта поглощенной дозы тем, что продукты радиолиза воды вызывают в субстрате возникновение химических реакций автокаталитического типа. Таким образом, теория непрямого действия явилась попыткой изучить изменение конкретных физико-химических процессов, обусловливающих дальнейшее поражение каждого живого объекта. Однако в настоящее время теория непрямого действия не в состоянии объяснить ряд известных фактов. Например, оказалось, что нет прямой зависимости между повышением содержания воды в семенах и их радиочувствительностью. При снижении концентрации воды от 10,5 до 3% радиочувствительность семян пшеницы повышается. Для некоторых семян бобовых при увеличении содержания воды сначала радиочувствительность увеличивается, а при еще бо́льшем содержании воды, наоборот, начинает падать. По-видимому, изменение количества воды в клетках семян бобовых приводит к изменению обмена, а при дальнейшем повышении ведет к водному параличу, сопровождающемуся резким уменьшением обменных процессов.

В первые годы возникновения теории непрямого действия очень большое значение придавали влиянию перекиси водорода, якобы образующейся в большом количестве при облучении. Однако ряд специально поставленных экспериментов показал, что перекись водорода не может иметь определяющего значения. Во-первых, количество ее, образующееся в живых тканях, не настолько велико, чтобы оказывать токсическое действие (при действии 600 *р* образуется 10^{-14} — 10^{-15} молекул перекиси на 1 *кг* ткани). Это количество вполне может быть разрушено каталазой, всегда присутствующей в ткани. В опытах же, где перекись вводилась в организм животных, не удалось показать сходство признаков поражения перекисью с признаками радиационного заболевания.

Не подтвердилось также предположение о повреждающем действии радикала HO_2, который очень активен при взаимодействии с неорганическими веществами. Этот радикал оказался гораздо менее активным при взаимодействии с веществами органическими. Много споров вызывает тот факт, что состояние воды в организме иное, чем в обычном растворе. Вода в организме является структурной водой, и поэтому радиолиз ее может быть изменен и участие продукта радиолиза воды в физико-химических процессах, возникающих в живой ткани, может быть иным.

Несмотря на то что не все явления, обнаруженные при действии радиации на живой объект, можно объяснить с точки зрения теории непрямого действия, она сыграла большую роль, так как направила внимание исследователей на изучение мате-

риальных физико-химических процессов, возникающих в живом объекте при облучении. Этим она выгодно отличается от теории мишени, которая с самого начала имела схоластический, формальный характер. Основным недостатком теории непрямого действия явился тот факт, что она объяснила биологическую эффективность получения только процессами, возникающими в водной фазе, и полностью игнорировала процессы, которые могли возникнуть и возникали в органическом субстрате живой ткани уже в первые моменты облучения.

О преобладающем значении непрямого действия может идти речь лишь при облучении органических веществ в водных растворах при условии, что соотношение между объемом растворителя и растворенного вещества меньше 1,5. Имеет оно место и при действии ионизирующей радиации на взвеси живых клеток, культивируемых в водном растворе. Например, на дрожжах диплоидной расы при изучении влияния кислорода было установлено, что LD_{50} при культивировании в водной среде равнялось 40 *кр*, при культивировании на агаре соответственно — 120 *кр*, т. е. в водной культуре преобладало непрямое действие, и радиочувствительность повышалась: на агаровой среде преобладало прямое действие. Непрямое действие имеет значение и при облучении в воде ряда одноклеточных организмов.

Теория прямого действия. Рассмотренные нами теории мишени и теория непрямого действия являются теориями, наиболее часто используемыми при изучении механизма действия ионизирующей радиации. Помимо этих теорий существовал и еще ряд попыток объяснить причину поражающего действия ионизирующей радиации прямым действием ее на органические молекулы живого субстрата, в частности на нуклеиновые кислоты, белки, особенно ферменты, на липиды и т. д. Указывалось и на значение возможного нарушения целостности структуры клеток, в частности, нарушения проницаемости клеточных мембран и т. п.

Из этих теорий интересна теория высвобождения ферментов, развиваемая Баком и Александером, согласно которой поражение живой клетки наступает в результате изменения проницаемости клеточных мембран (отграничивающих ферменты от субстрата клеток), вследствие чего происходит высвобождение фермента. Это высвобождение ферментов приводит к возникновению в клетках химических процессов, приводящих к ее поражению.

Известна также физико-химическая теория Н. М. Эмануэля, Е. Б. Бурлаковой и других, связывающая поражение живого объекта с возникновением в ткани радикальных состояний, определяющих последующее поражение этой ткани. Согласно представлению этих авторов, радикалы, возникающие в важнейших биохимических компонентах клеток (белки, нуклеиновые кислоты, липиды), не свойственны организму в норме, а поэтому они резко изменяют нормальный метаболизм. На основе этих

представлений было предложено применять ингибиторы свободно радикальных реакций в качестве радиозащитных средств. Довольно давно возникла гипотеза о возникновении в ткани токсина при действии ионизирующей радиации, так называемая теория токсического действия. Некоторые последователи этой теории (F. Ellinger) предполагали, что поражение живого объекта во время облучения происходит за счет возникновения в ней гистамина. Гистамин появляется в тканях вскоре после облучения. Однако характер гистаминного отравления отличается от развития лучевого поражения, например, не имеет инкубационного периода, т. е. кинетика накопления гистамина отличается от кинетики развития лучевого поражения.

Другими исследователями было обнаружено появление в крови особых лейкотоксинов, особенно в первые часы после облучения. Специальные опыты по обнаружению токсинов в крови, поставленные на животных с перекрещенным кровообращением, дали противоречивые результаты. Получены некоторые данные, указывающие на накопление токсических продуктов в культуре тканей, так как промывание их способствовало выживанию после облучения (А. И. Крантовский). В последние годы установлено, что при облучении возникает и ряд других токсических веществ — хинонов (А. И. Кузин), липотоксинов (Ю. Б. Кудряшов) и др. Наличие каких-то токсических продуктов подтверждается и из опытов, показавших повышение радиочувствительности живых клеток в зависимости от густоты взвеси, появления токсического фактора в воде, в которой облучалась взвесь клеток, и т. д. Все эти опыты приводят к выводу, что в живых организмах возникают определенные вещества, обладающие токсическим действием. Эти вещества являются сопутствующими веществами при развитии в облученной ткани основных химических процессов, приводящих к поражению. Они часто появляются в малых количествах вначале, а затем количество их резко увеличивается лишь в конце лучевого заболевания. Эти вещества не определяют развития процессов поражения. Поэтому теории токсического фактора не объясняют механизм лучевого поражения.

ТЕОРИЯ ЦЕПНЫХ ПРОЦЕССОВ

Из всех существующих в настоящее время теорий лучевого поражения большого внимания заслуживает теория цепных процессов, развиваемая Б. Н. Тарусовым и его сотрудниками в течение последних 10—15 лет. Согласно этой теории, биологическая эффективность ионизирующей радиации определяется возникновением и развитием в живом субстрате особых химических реакций автокаталитического типа. В результате поглощения энергии излучений молекулами живой ткани в ней происходит возбужде-

ние атомов и молекул, возникают ионы, радикалы и перекиси. Все они обладают высокой химической активностью и являются промоторами ряда реакций, в том числе и цепных окислительных реакций. Последние, постепенно развиваясь, приводят к нарушению нормальных химических процессов, нормальных функций и обусловливают дальнейшее развитие патологического состояния — лучевого заболевания. Чем обусловливается возникновение этих, определяющих дальнейшее поражение процессов, непрямым ли действием через радиолиз воды живой ткани или прямым поглощением энергии органическими молекулами, принципиального значения не имеет.

Нужно полагать, что в первичных реакциях лучевого поражения в живом субстрате имеют место оба эти действия. В большинстве случаев они вызывают одни и те же реакции. Для возникновения поражения и развития определенных химических процессов имеет значение и реакционная способность живого субстрата. О том, что в живой ткани под влиянием действия ионизирующей радиации возникают активные химические продукты, можно судить на основании довольно большого количества работ по определению в ней этих активных продуктов.

Возникновение свободных радикалов. В последние годы было опубликовано много работ, посвященных обнаружению свободных радикалов методом парамагнитного резонанса (см. гл. III). Пользуясь этим методом, удалось обнаружить изменение количества свободных радикалов при облучении живых объектов. Установлено также появление радикалов в аминокислотах и белках при действии довольно больших доз радиации и при облучении нуклеиновых кислот. Установлено образование радикалов в высушенных тканях облученных животных, например селезенки, при облучении эмбрионов, дрожжевых клеток и т. д. В исследованиях, поставленных с дрожжевыми клетками, удалось установить наличие сигнала как в водной фазе, так и в органическом субстрате, причем при защите β-меркаптоэтиламином количество свободных радикалов в органической фракции резко уменьшалось, радикалы же водной фазы не менялись.

Все эти работы с несомненностью показали изменение количества свободных радикалов в живом объекте при облучении его ионизирующей радиацией. Однако установить связь между количеством свободных радикалов и их ролью в развитии лучевого поражения пока не удалось. Метод *ЭПР* не лишен недостатков, связанных с тем, что в большинстве работ пользовались высушенными объектами, что, возможно, искажало несколько действительную картину. Кроме того, очень активные мало живущие радикалы могли и не улавливаться. Поэтому был использован и другой метод определения свободных радикалов — метод полимерной прививки (см. гл. III). Известно, что по величине полимеризации можно оценить количество радикалов. Таким методом

удалось установить увеличение количества радикалов в живой клетке при облучении (дрожжи, семена пшеницы) γ-лучами. В одной из этих работ было обнаружено, что в присутствии кислорода с повышением температуры прививка увеличивается, а в отсутствие кислорода уменьшается. На основании этих опытов авторы пришли к выводу, что в присутствии кислорода идут окислительные процессы, для которых имеют значение перекисные радикалы в перекиси. В отсутствие же кислорода, как известно, свободнорадикальные реакции гораздо менее интенсивны. В отсутствие кислорода возможны и реакции неокислительного типа. Метод привитой сополимеризации показал возникновение свободных радикалов в живой ткани при облучении.

Определенные сведения об образовании радикалов при облучении были получены и из излучения сверхслабых световых потоков (10—100 *кв/сек*) — хемилюминесценции, которая сопровождает окислительные реакции экзотермического характера. Она может наблюдаться при реакциях радикального и ионного характера и возникать при реакциях рекомбинации радикалов, при распаде перекисей водорода в результате реакции ионного типа и т. д. Некоторыми авторами была изучена хемилюминесценция некоторых органов облученных животных и растений и показано увеличение ее после облучения. Эти авторы считают, что хемилюминесценция указывает на увеличение числа свободных радикалов в окислительных процессах после облучения.

Возникновение перекисей. Большое значение в анализе механизма первичных процессов лучевого поражения имеет обнаружение в живом субстрате гидроперекисей и перекисей. Их образование может быть связано с перекисными радикалами. В то же самое время перекиси могут служить источником свободных радикалов. Обнаружение перекисей в субстрате представляет большой интерес, так как обладая большой активностью, они в состоянии инициировать ряд химических реакций и наличие их указывает на возможность возникновения в субстрате определенных химических процессов. В литературе известно довольно большое количество работ, в которых обнаружено увеличение общего количества перекисей в тканях облученных организмов. Впервые они были обнаружены Хорганом и Фильпотом (V. Horgan a. J. Philpot) в бутаноловой вытяжке из тканей облученных животных. Перекиси были обнаружены и другими авторами в митохондриях, в печени, в коже и других тканях животных. Причем оказалось, что они образуются при средних — летальных и малых дозах, а при очень больших дозах порядка 20 000 *р* их обнаружить не удалось. Повышенное количество перекисей было обнаружено в липидных фракциях ткани; они были найдены также и в нуклеиновых кислотах. Увеличение перекисей отмечается в ранние периоды после облучения, их количество несколько времени держится на одном уровне, затем начинает снижаться.

При предварительном введении антиокислителей их образуется меньше.

Возникновение гемолизинов. Впервые в 50-х годах было отмечено появление в печени облученных животных вещества, вызывающего гемолиз эритроцитов — гемолизина. В последующих работах многими исследователями было показано образование гемолизина во многих органах облученных животных и изучены кривые их накопления. В этих работах было установлено, что накопление гемолизина идет параллельно развитию лучевого поражения. Некоторые исследователи пытались установить химическую природу гемолизина. Было найдено, что гемолизины, по-видимому, являются ненасыщенными жирными кислотами и продуктами их окисления. Ненасыщенные жирные кислоты и продукты их окисления (альдегиды, кетоны) обладают токсическим действием и являются радиомиметиками, т. е. введение их в организм здорового животного вызывает в нем ряд изменений, аналогичных изменениям при облучении.

Радиомиметические вещества. В последние годы было установлено, что ряд химических веществ оказывает на живую клетку воздействие, напоминающее действие ионизирующей радиации. Такие вещества назвали радиомиметическими веществами. К ним относятся азотистые иприты, этиленамины, эпоксиды и др. Эти вещества вызывают и хронические изменения в костном мозге, половых органах, кишечнике, гибель лимфоцитов, поседение волос, подавляют рост некоторых злокачественных опухолей, вызывают, образование антител структурные изменения ядра, приводят к изменению наследственных признаков и т. д. Ряд химических веществ, образующихся в тканях облученных животных, введенный здоровым животным, также вызывают изменения, напоминающие признаки лучевого поражения. Они названы естественными радиомиметиками. К ним относятся липоперекиси, ненасыщенные жирные кислоты и продукты их окисления. Радиомиметическое действие окисленной олеиновой кислоты, извлеченных из тканей облученных животных эпоксидов, ненасыщенных жирных кислот, альдегидов и кетонов указывают на то, что при облучении в ткани животных образуется ряд продуктов окисления, оказывающих токсическое действие и могущих служить естественными радиомиметиками.

Типы химических реакций, возникающих при лучевом поражении. Таким образом, на основании ряда экспериментальных работ может считаться доказанным, что при облучении в живых тканях возникает ряд химических реакций, в известной мере обусловливающих поражение животных. О каких же типах химических реакций может идти речь? На основании наших знаний о химических продуктах, возникающих в живом объекте при облучении, и на основании изучения кинетики процессов поражения ряд авторов приходит к определенному заключению

о характере этих реакций. Из анализа кривых гибели животных во времени после облучения можно сделать вывод о возникновении при облучении трех реакций, определяющих, по-видимому, поражение — об одной неокислительного типа и двух окислительных реакциях.

Реакции неокислительного типа являются реакциями, определяющими поражения при действии лишь очень больших доз излучений с малой плотностью ионизации, а также при действии на живые объекты излучений с большой плотностью ионизации.

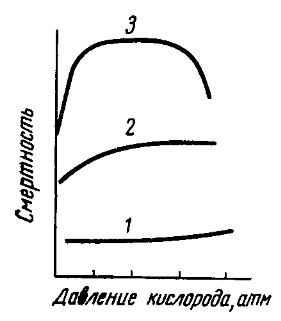


Рис. 136. Влияние давления кислорода на гибель дрожжей. Доза — 60—300 *кр*. Объяснение см. в тексте

При действии излучений, вызывающих малую плотность ионизации в зоне малых и средних доз (в том числе и абсолютно летальных), преобладающими будут две окислительные реакции. По мнению ряда авторов, одна из этих окислительных реакций — цепная неразветвленная, вторая — цепная разветвленная с вырожденным разветвлением. Изучение зависимости поражения от концентрации кислорода подтверждает это предположение (рис. 136). Действительно, гибель дрожжей в первые часы после облучения не зависит от количества кислорода (кривая *1*). Это привело к предположению, что реакция, обусловливающая в этом случае поражение, не зависит от кислорода, т. е. является реакцией неокислительного типа. Гибель дрожжей в более далекие сроки после облучения зависит от кислорода (кривые *2* и *3*). Одна из этих кривых указывает на наличие нижнего кислородного предела, другая — на наличие и верхнего и нижнего пределов. Авторы полагают, что гибель клеток в этих случаях обусловливается окислительными цепными процессами, в первом случае — цепными неразветвленными реакциями, во втором — цепными разветвленными.

Возникновение неокислительных реакций также подтверждается опытами с полимерной прививкой, в которых было установлено уменьшение полимеризации при увеличении температуры в присутствии кислорода. Существование двух окислительных реакций при действии ионизирующей радиации подтверждают и опыты на гидрах (Г. Г. Поликарпов). Изучалась кинетика сокращения тела гидр и температурный коэффициент этой реакции при действии γ-излучений. Была обнаружена экспоненциальная зависимость и $Q_{10} = 2{,}5$ при действии средних доз; S — кривая и $Q_{10} = 3{,}5$ при действии малых доз. Автор также предполагает, что в первом случае реакцией, определяющей поражение, является цепная реакция с неразветвленными цепями, во втором — цепная реакция с разветвленными цепями.

Подобная зависимость кинетики поражения от дозы облучения была получена и рядом других авторов для дрожжей и других объектов. Изменения формы кривой поражения для одного и того же объекта в зависимости от дозы также можно считать доказательством того, что при различных дозах реакции, обусловливающие поражение, могут быть различными.

Итак, согласно теории цепных процессов Б. Н. Тарусова, радиационное поражение живого объекта будет определяться возникновением в живом субстрате цепных окислительных реакций. В начале облучения в этом субстрате возникает определенное количество радикалов и перекисей, часть которых может уже в первый момент облучения реагировать с другими молекулами (не определяющими основную реакцию) и рекомбинироваться, часть же вызывает зарождение цепи. В начале поражения реакция идет медленно, количество продуктов, определяющих основную реакцию, невелико и особых изменений в ткани обнаружить нельзя — это период мнимого благополучия, или индукционный период. В это время система находится в стационарном состоянии; при дальнейшем накоплении радикалов и перекисей система переходит из стационарного состояния в нестационарное и реакция начинает развиваться с самоускорением, возникают цепные процессы.

Основные признаки цепных процессов. Основными признаками цепных процессов, возникающих в тканях облученных животных, Б. Н. Тарусов считает: 1) развитие основных реакций, обеспечивающих процесс, подчиняется закону самоускорения (A^x); 2) высокая энергия активации (20 000—40 000 *кал/моль*); 3) высокий ионный выход (порядка 10^3—10^7); 4) наличие начальных высокоактивных химических центров, обеспечивающих зарождение реакции и наличие промежуточных и конечных продуктов, обеспечивающих развитие процесса; 5) кинетика накопления промежуточных и конечных продуктов имеет вполне определенную закономерность. Б. Н. Тарусов предполагает, что одним из субстратов, где могут развиваться цепные реакции, являются липиды. Кинетика образования окислительных продуктов липидов в опытах in vivo и in vitro носит один и тот же характер. Например, концентрация веществ, являющихся промежуточными продуктами окисления липидов, проходит через максимум и при развитии лучевого поражения. Количество же конечных продуктов увеличивается постепенно, параллельно развитию лучевого поражения и достигает максимума в конце реакции. На рис. 137 представлено накопление промежуточных продуктов — перекисей и радикалов — и конечных — непредель-

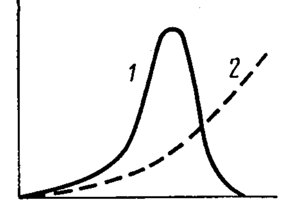


Рис. 137. Кривая накопления промежуточных (*1*) и конечных (*2*) продуктов при цепных разветвленных реакциях

ных жирных кислот и продуктов их окисления. К концу поражения наблюдается максимум конечных продуктов и минимум промежуточных; 6) неподчинение закону Аррениуса, заключающемуся в том, что зависимость логарифма скорости реакции от обратной абсолютной температуры нелинейна. Энергия активации как бы увеличивается с температурой; 7) подавление реакции ингибиторами, инактивирующими радикал и перекиси; 8) наличие хемилюминесценции, сопровождающей реакции радикалов и перекисных соединений; 9) наличие верхних и нижних кислородных пределов. Б. Н. Тарусов считает, что все перечисленные признаки цепной реакции имеют место при лучевом поражении, и это подтверждает предположение о возникновении и развитии в живой ткани цепных процессов.

Роль липидов в возникновении цепных процессов. В каком же субстрате возможно возникновение окислительной реакции цепного типа? Эти реакции должны легче всего возникать в субстратах, более богатых двойными связями (углеводы, жиры). Есть все основания полагать, что в живом организме цепные процессы возникают в липидах, в которых свободные периферические связи обеспечивают возникновение окислительных цепных процессов.

В литературе имеются убедительные данные о возникновении цепных процессов окисления в техническом жире, о возникновении цепных разветвленных реакций в жирах биологического происхождения и об ускорении этих реакций при облучении (сквален, подсолнечное масло, сливочное масло, рыбий жир, жир, извлеченный из печени облученных животных, и т. д.). Подтверждением того, что окислительные реакции развиваются именно в липидах, является тот факт, что в облученных тканях увеличивается количество липоперекисей, непредельных жирных кислот и продуктов их окисления. Появление окислительных процессов и значение их в развитии лучевого поражения находит косвенное подтверждение в том, что почти все защитные вещества являются антиокислителями.

Нарушение живых структур. Липиды, как хорошо известно, являются частью лепидопротеинового комплекса в живых клетках и с ними связана основная структура клеток.

При возникновении в липидной части комплекса окислительных процессов структура должна расшатываться. Нарушение целостности структуры может иметь большое значение для дальнейшего развития процессов поражения.

В настоящее время имеется ряд экспериментальных работ, показывающих, что при действии ионизирующей радиации происходит нарушение целостности основной структуры живой клетки и ткани. Такой вывод можно сделать на основании ряда работ, исследующих целостность структуры методом электропроводности. В этих работах было исследовано изменение величи-

ны сопротивления, емкости, поляризации, угла диэлектрических потерь мышечной ткани, ткани печени, подкожной клетчатки и т. д. Было найдено уменьшение дисперсии сопротивления и емкости, изменение тангенса угла потерь, поляризации, что говорит об изменении структуры. Это подтверждается электронно-микроскопической картиной. Имеется указание на увеличение автолитических процессов в ткани в ранний период после облучения, что также может быть следствием определенного расшатывания липопротеинового комплекса нарушения структуры. Это создает условия, облегчающие соприкосновения фермента и субстрата. Интересно, что в переживающих тканях и органах облученных животных скорость автолитических процессов значительно возрастает, что указывает на нарушение целостности структуры. Несмотря на то, что липиды являются легко окислимым субстратом, в нормальной ткани мы не можем отметить той степени окисления, какую наблюдают при облучении животных. Эта стойкость, по-видимому, определяется структурой и наличием в тканях ингибиторов — антиоокислителей.

Значение природных ингибиторов. Антиокислители могут защитить химические активные органические молекулы от перекисей и радикалов, обнаруживающихся в ходе нормальных биохимических процессов. Рядом авторов исследовалась кинетика окисления липидов в присутствии ингибиторов антиокислителей, причем установлена возможность развития процессов окисления в их присутствии. Однако процесс идет очень медленно. В присутствии достаточного количества антиокислителей отмечается медленное течение реакции в стационарном режиме (инкубационный период). Этот режим сохраняется до тех пор, пока не израсходуется определенное количество ингибиторов до концентрации, когда реакция переходит из стационарного в нестационарный режим и реакция окисления начинает быстро развиваться. Было показано (А. И. Журавлев) при определении количества антиокислителей и перекисей в липидной фракции печени облученных крыс, что для перехода из стационарного состояния в нестационарное достаточно уменьшить количество естественных антиокислителей на 10—15%.

Реакции неокислительного характера. Помимо окислительных процессов, как было указано выше, в тканях облученных животных развиваются неокислительные процессы. Подтверждением этому является тот факт, что защитные вещества — антиокислители и снижение кислорода не осуществляют полной защиты. При действии больших и очень больших доз, например, при так называемой смерти под лучом, смерть организма будет обусловливаться неокислительным процессом. Развитие других химических реакций определяет также поражение организма при действии на организм излучения с большой плотностью ионизации. Теория цепных процессов, однако, не отрицает возможность и большое

значение других реакций (неокислительных) и при поражении организмов излучением с малой плотностью ионизации. Субстратом, в котором они возникают, могут быть не только липиды, но и нуклеиновые кислоты, углеводы, белки, особенно ферменты и т. д. Из имеющегося в настоящее время экспериментального материала следует возникновение автолитических процессов уже в ранние сроки после облучения. Автолитические процессы, несомненно, имеют значение в развитии лучевого поражения и сопряжены с процессами окисления липидов.

Объяснение закономерностей лучевого поражения с позиций цепных реакций. Все известные в настоящее время закономерности лучевого поражения (в области указанных видов излучение и доз) могут быть хорошо объяснены закономерностями развития цепных процессов в липидах. С позиции этой гипотезы хорошо объясняются кривые гибели в зависимости от дозы, пики смертности в зависимости от времени после облучения, наличие инкубационного периода, зависимость от температуры, влияние кислорода, верхний и нижний кислородный предел, явление химической защиты, радиочувствительность организмов и явление восстановления. Например, радиочувствительность различных живых тканей с точки зрения этой теории будет определяться наличием в них физико-химических условий, обеспечивающих возможность возникновения и развития цепных процессов, т. е. радиочувствительность будет зависеть от реакционной способности биохимической системы клеток, их стабильности, наличия в ней ингибиторов — антиокислителей, веществ, задерживающих автолиз, которые предохраняют структуру от разрушения.

Интересно, что наиболее радиочувствительные живые объекты обладают ингибиторами, например, хлорофиллом, каротинами и другими, которые реагируют с органическими перекисными радикалами и перекисями. Например, низкой радиочувствительностью обладают зеленые части растений, расы бактерий Sarcin, содержащие каротин. Полулетальная доза для бактерий, содержащих каротин, доходит до 10^6 *р*. В животных клетках такими антиокислителями являются токоферол (витамин Е) и т. д. Была установлена высокая антиокислительная активность ряда экстрактов из органов, например печени, и др. Антиокислительная активность из этих же органов, облученных животных, значительно ниже. Радиочувствительность живой ткани также будет зависеть от присутствия в тканях систем, ингибирующих самопроизвольные реакции распада, например, природных веществ, ингибирующих автолиз. Имеет значение также возможность удаления из клеток и тканей продуктов реакции, несвойственных нормальному течению процессов.

С точки зрения химико-кинетической теории можно объяснить и восстановление. Явление восстановления при облучении дробными дозами объектов в определенных условиях свидетельствует

о том, что возникающие в клетках химические процессы затормаживаются, происходит задержка развития реакции. Развитие цепной реакции зависит от соотношения вероятностей развития (1) и обрыва цепи (β). Вероятность развития реакции (1 — β) будет зависеть от количества и реакционной способности первичных продуктов, обусловливающих зарождение и развитие цепи. Вероятность обрыва (β) будет определяться вероятностью гибели активных промежуточных продуктов в результате их рекомбинации с посторонними химическими веществами, не участвующими в реакции, или же уходом их из зоны реакций в результате диффузии. В том случае, когда $\beta > (1 - \beta)$ будет происходить затухание, торможение реакции. В этом случае и будет наблюдаться то явление, называемое восстановлением. Соотношение вероятностей возникновения и обрыва цепей будет определять и отмеченное выше влияние температуры, условий питания и дробного облучения.

Установленная рядом авторов количественная зависимость между смертностью и дозой облучения, вычисляемая согласно уравнению Пуассона, также может быть объяснена, исходя из теории цепных процессов. Для зарождения цепи необходимо наличие в субстрате активных продуктов, обладающих большой энергией активации, и соответствующими физико-химическими условиями для ее развития. Вероятность возникновения таких центров, вероятность зарождения, а также вероятность развития цепи будут определять возникновение лучевого поражения и гибель живого объекта. Поэтому гибель животного и будет определяться уравнением Пуассона.

Теория цепных процессов может также объяснить известную диспропорцию между количеством поглощенной энергии и биологическим эффектом. То количество энергии, которое поглощается живой тканью, вполне достаточно для возникновения химического автокаталитического процесса. Само развитие сложной цепной реакции не требует дополнительного большого количества энергии, биологические же последствия этой реакции огромны. Возникающие цепные реакции в липидах живой структуры приводят к ее нарушению, возникновению ряда других, в частности, автолитических процессов. Все это нарушает нормальную функцию организма и приводит к развитию патологического состояния — возникновению лучевого заболевания.

Таким образом, теория цепных процессов дает объяснение первичных механизмов лучевого поражения.

ГЛАВА XIII

КЛЕТОЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ

Живая клетка представляет собой высокоорганизованную единицу, характеризуемую на физико-химическом уровне способностью к проведению большого числа непрерывно идущих реакций, обусловливающих различные виды жизнедеятельности. Однако, как известно, клеточная теория постулирует прерывистый характер роста биологических систем. Предел, до которого клетка способна увеличивать свою массу, строго ограничен. По достижении этого предела клетка должна разделиться на две, каждая из которых повторяет процесс роста путем увеличения своей массы за счет внешней среды. Таким образом, клетки либо стареют и умирают, либо они растут и воспроизводят себе подобные клетки.

Физические и химические основы преемственности в живых системах были до недавнего времени выяснены только в общих чертах. С развитием цитологии и молекулярной биологии было показано, что определенные ядерные структуры поддерживают свою целостность от одного клеточного поколения к другому и именно они ответственны за передачу признаков. Роль других частей клетки в этом процессе пока является предметом исследований. Во всяком случае, очень важно, что отдельная клетка обладает определенной организацией, что ее фенотип является результатом этой организации. Стабильность характера клеточных поколений обеспечивается сложным механизмом клеточного деления, благодаря которому воспроизведение происходит без нарушения физико-химической природы клеточной организации.

Изучение механизма клеточного деления пока еще носит разведывательный характер.

Однако сейчас накопилось довольно большое количество данных, которые позволяют исследователю выбирать более реальные пути к изучению этой проблемы. В настоящее время ясно, что механизм клеточного деления не может быть ограничен какимнибудь одним ключевым процессом или пусковым фактором, а является свойством целостной клетки и теснейшим образом связан с ее жизнедеятельностью.

Отсюда следует, что возможен не один, а несколько механизмов, совокупность которых обусловливает деление. Кроме того, почти все реакции, относящиеся к различным функциональным процессам клетки, в той или другой степени участвуют в этом явлении.

МИТОТИЧЕСКИЙ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КЛЕТКИ

В течение жизни каждой клетки имеются два периода — интерфазный и митотический. Оба периода характеризуются, главным образом, изменениями в строении ядра при относительной стабильности состояния цитоплазмы. На протяжении всей жизни клетки ядро выполняет две отдельные, хотя и связанные между собой функции: одна из них состоит в передаче наследственного материала от одной генерации клеток к следующей, а другая связана с влиянием этого материала на метаболизм. Весьма возможно, что ядро — это единственная часть клетки, которая безусловно должна быть распределена поровну в поколении, чтобы поддержать биологическую преемственность. Однако из этого не следует, что цитоплазма не имеет значения и возможно ее качественно неравномерное разделение. Ядро и цитоплазма, хотя и представляют различные метаболические системы, не являются независимыми частями клетки. Живой системой является целая клетка, хотя удаление ядра из клетки не всегда приводит к ее немедленной смерти. С другой стороны, изолированные ядра не способны создавать цитоплазму или делиться. Живая клетка, чтобы жить и делиться, должна обладать обеими частями.

Клеточное деление не ограничивается видимыми в микроскоп митотическими движениями (митозом), а представляет собой чрезвычайно сложный процесс, при помощи которого клеточный материал равномерно распределяется между дочерними клетками. Митоз составляет лишь небольшую часть митотического цикла. Прежде чем клетка делится митотически, происходит удвоение и деление всех ее основных компонентов, особенно тех, которые участвуют в передаче наследственных свойств. В этом смысле клеточное деление или митоз можно рассматривать как окончательное разъединение уже удвоившихся единиц.

Началом клеточного деления принято считать тот момент, когда в покоящейся клетке начинаются видимые в микроскоп внутриядерные изменения. Сначала наступает деление ядра, а затем и цитоплазмы. Ядерный цикл клетки достаточно изучен. Как правило, этот цикл проявляется в виде последовательно протекающих структурных изменений. На рис. 138 изображена известная схема отдельных фаз митоза. В тех случаях, когда клетки находятся в логарифмической фазе роста, т. е. каждый последующий цикл деления начинается сразу же после оконча-

ния предыдущего цикла, митотический цикл совпадает со всем периодом существования клетки. Однако такое совпадение не является обязательным и во многих случаях жизненный цикл бывает гораздо более длинным, чем митотический цикл. Так

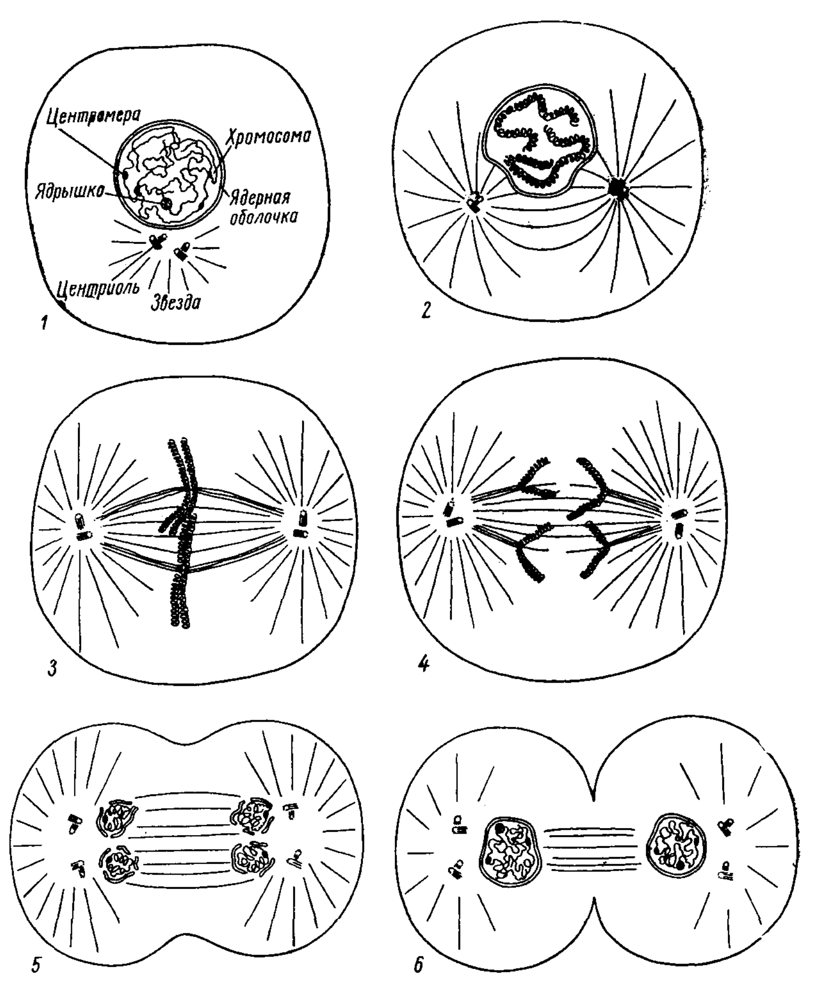


Рис. 138. Последовательные стадии митоза: *1* — интерфаза, *2* — профаза, *3* — метафаза, *4* — анафаза, *5* — телофаза, *6* — дочерние клетки

бывает, например, в случае деления ядра без разделения клеточного тела (образование многоядерных клеток), в случае увеличения клеточной массы без вступления в митоз (ølитения), а также в случае дифференцировки клеток с вступлением обратно в митотический цикл. Длительность самого митоза для большинства

типов клеток не превышает нескольких десятков минут. Самой длительной из стадий митоза является профаза, а наименее длительной — анафаза. Метафаза и телофаза по времени примерно одинаковы и занимают промежуточные положения между профазой и анафазой.

Как интерфазный период, так и период митоза слагаются из многочисленных элементов митотических циклов, последовательно распределенных во времени. Наиболее важные процессы, определяющие деление клетки, развиваются в период интерфазы.

При быстро следующих друг за другом делениях интерфаза представляет собой точку схождения конца телофазы с началом профазы.

Функциональное значение интерфазного ядра заключается в его метаболической активности, главным образом, синтетической деятельности. В интерфазном состоянии ядро отделено от цитоплазмы оболочкой, которая обладает специфической проницаемостью и образует с цитоплазмой гетерогенную систему, находящуюся в состоянии динамического равновесия. В этом состоянии ядро, как и цитоплазма, не способно к самостоятельному существованию, и это показывает, что для поддержания нормального обмена необходимо взаимодействие между этими двумя компонентами клетки. В интерфазном ядре живой клетки часто не видно ничего, кроме ядрышек. Хроматиновые нити достигают максимального размера и становятся чрезвычайно тонкими, приобретая зигзагообразную форму с широкими витками. Такая разветвленность ведет к увеличению ядерной поверхности, что имеет большое значение в повышенной интенсивности взаимодействия между ядром и цитоплазмой.

ПОДГОТОВКА К МИТОЗУ

Наиболее важным подготовительным процессом клеточного деления, который происходит в интерфазе, является рост массы клетки. Давно было замечено наличие причинной зависимости между ростом и делением. Прежде чем наступит деление, клетки обязательно должны вырасти до определенного размера. Предел роста клетки определяется соотношением между объемом цитоплазмы и объемом ядра. Количественно эта закономерность впервые была сформулирована в работах Гертвига (R. Hertwig). Она выражается при помощи так называемого ядерно-плазменного отношения:

$$NP = \frac{V_n}{V_c - V_n}, \qquad (13.1)$$

где V_n — объем ядра, V_c — объем клетки.

Согласно этой гипотезы ядерно-плазменное отношение нарушается при определенной «критической» массе цитоплазмы,

и дальнейший рост цитоплазмы привел бы к существенным изменениям физиологического равновесия в клетке. Дело в том, что по мере увеличения объема цитоплазмы ядро утрачивает способность регулировать происходящие в клетке процессы, в результате чего возникает неустойчивое состояние, которое ликвидируется наступлением деления. Изучение роста одиночных клеток показывает, что увеличение массы клетки начинается с посттелофазной стадии митоза (с дочерней клетки) и заканчивается в делящейся клетке.

Однако соотношение между массами цитоплазмы и ядра само по себе еще не служит непосредственным фактором, вызывающим деление. В настоящее время хорошо известно, что рост клетки в основном заканчивается задолго до наступления деления. Кроме того, экспериментально удается разделить рост и деление во времени.

В работе Х. Джинер и Р. Джинер (H. Jerner a. R. Jerner) было установлено, что если штамм termobacterum acidophilus, нуждающийся в ДНК или ее нуклеозидах, лишить экзогенной ДНК, то клетки достигают длины, в 35—40 раз превышающей нормальную. Эти клетки, достигнув таких огромных размеров, сохраняют способность к делению и при добавлении ДНК в среду сразу же делятся, восстанавливая нормальное ядерно-плазменное отношение.

Тем не менее существует тесная связь между ростом и делением. В противном случае несогласованность между этими процессами могла бы привести либо к чрезмерному уменьшению, либо к значительному увеличению размера клеток, что не наблюдается в природе. Кроме того, во время роста в клетке происходят синтетические процессы, имеющие специфическое значение для подготовки к митозу.

Центральным элементом клеточного деления является репродукция хромосом.

Среди растений, животных и микроорганизмов распространено непрямое деление, или митоз, когда деление клеток в целом определяется циклом воспроизведения ядер. Существует множество разнообразных типов митоза. Но тем не менее некоторые признаки всех митозов указывают, что по существу это явление одной и той же природы. К таким признакам относится прежде всего появление в течение митотического цикла хромосом, представляющих собой своеобразные органоиды.

Хромосомы являются основными ядерными компонентами, обладающими особой организацией, индивидуальностью и функцией. Они способны к самовоспроизведению и к сохранению своих морфологических и физиологических свойств на протяжении последовательного ряда клеточных делений. Обычно хромосомы становятся видимыми только во время клеточного деления. Однако эти элементы представляют собой, вероятно, постоянные

структурные единицы ядра на всех стадиях жизни клетки. Во время митоза хромосомы имеют вид цилиндрических телец, относительно плотной консистенции, интенсивно окрашивающихся основными красителями. Форма хромосомы определяется перетяжкой, локализованной в том месте, где встречаются плечи хромосом. Внутри этой перетяжки имеется зона, в которой находится небольшая гранула — центромера, имеющая функциональное значение при движении хромосом, происходящем во время митоза.

Значение хромосом может быть понятно в связи с выяснением механизма митоза. Так Мезия (D. Mazia) приходит к выводу, что если митоз — это приспособление для распределения генов между дочерними клетками, то хромосомы следует считать системой, в которой многочисленные гены «упакованы» в небольшое число «пакетов». Поскольку число наследственных единиц огромно по сравнению с числом хромосом, а сами генетические элементы не могут самостоятельно участвовать в митотических движениях, то можно представить, что хромосомы являются приспособлением для прикрепления большого числа генов к небольшому числу центромер, которые ответственны за митотическое движение.

Важнейшим составным элементом хромосом является ДНК. Согласно широко принятому положению основным генетическим материалом во всех формах жизни является нуклеиновая кислота, в основном ДНК. У некоторых бактерий нуклеиновая кислота представлена РНК. Считается, что ДНК не только управляет синтезом белков и развитием клеток, но и представляет собой то вещество, которое должно воспроизводиться и обеспечивать, таким образом, тождественное развитие данной клетки. Теперь точно установлено, что вся клеточная ДНК за очень немногими исключениями локализована в ее хромосомах. Исследование клеток разных типов показало, что в большинстве ядер содержание ДНК практически постоянно и связано с числом хромосомных наборов.

В гаплоидных клетках содержится вдвое меньше ДНК, чем в диплоидных клетках. В полиплоидных клетках наблюдается возрастание содержания ДНК с увеличением числа хромосомных наборов. Девидсон и Говард (J. Davidson a. A. Howard) установили, что ДНК в клетке не находится в динамическом состоянии и не обменивается так быстро, как другие вещества, входящие в состав клетки.

В процессе клеточного деления ДНК, локализованная в хромосомах, подвергается своеобразному удвоению, в результате которого в обе дочерние клетки попадают равные количества ДНК, причем физико-химическая структура ее оказывается та же, что и в материнской клетке.

Выдвинутая Уитсоном и Криком структурная модель ДНК в форме двойной цепи (см. стр. 139), позволяет без затруднения

объяснить механизм удвоения молекулы. Согласно этой гипотезы, удвоению предшествует разделение двух цепей, каждая из которых служит в дальнейшем матрицей для образования своей копии.

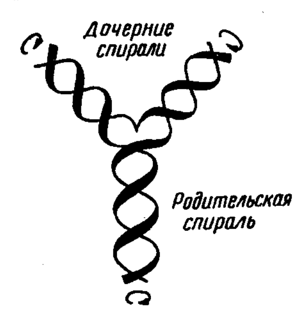


Рис. 139. Схема, иллюстрирующая возможный механизм удвоения молекул ДНК

При этом цепи сначала разделяются на одном из концов двойной спирали, образуя Y-образную конфигурацию, затем начинается процесс объединения новых нуклеотидов в правильной последовательности двух ветвей, причем по мере полимеризации двух новых цепей прежняя спираль продолжает раскручиваться. При этом механизме воспроизведения каждая новосинтезированная молекула ДНК гибридна, т. е. состоит из одной материнской и одной дочерней цепи (рис. 139).

Следует отметить, что клеточный механизм синтеза ДНК является весьма сложным процессом, в нем принимает участие система ферментов, внутренняя среда клетки и метаболический аппарат ядра в целом. Однако общие закономерности биологического синтеза этого процесса хорошо согласуются с гипотезой Уитсона и Крика. Радиоавтографические исследования синтеза ДНК в клетке подтверждают правильность поликонсервативного механизма удвоения ДНК, т. е. синтеза новой молекулы при целостном сохранении отдельной цепочки исходной молекулы ДНК. Этот механизм был продемонстрирован в опытах с делящимися хромосомами клеток корня конских бобов. Растущие клетки сначала вводили в среду, в которой находился тимидин, меченный тритием; тимидин, как известно, включается только в клеточную ДНК. Затем изучали их после одного или двух делений в нормальной среде. Схематично результаты этих опытов представлены на рис. 140.

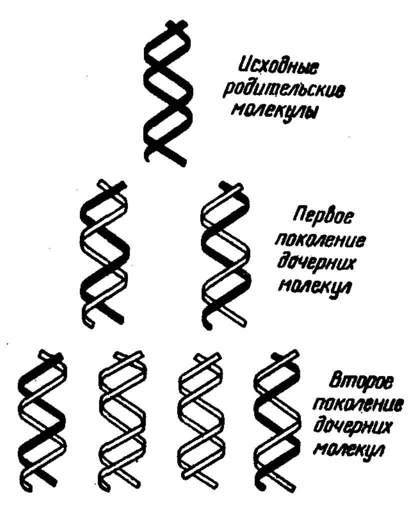


Рис. 140. Схема изменения изотопного состава ДНК при делении клеток, содержащих меченую ДНК. Светлые полосы — немеченая ДНК; темные — меченая ДНК

Более новые исследования выдвигают другой механизм удвоения молекулы ДНК. В основу кладется предположение в том, что при синтезе ДНК двойная спираль материнской молекулы сохраняется. При этом, так называемом консервативном меха-

низме, матрицей для синтеза новой макромолекулы служит или сама исходная двойная спираль ДНК, или какая-то матрица-посредник, синтезированная с помощью исходной двухнитчатой ДНК. Оказалось, что субъединица ДНК делящихся клеток является двойной спиралью. Однако опыты, проведенные с ДНК, изолированной из синхронизированных культур *E. coli* на разных этапах цикла деления, показали, что в начале деления ДНК является четырехнитчатой, а в момент, когда начинается синтез ДНК, молекула становится двухнитчатой. На основании этих данных предполагается, что в цикле редупликации ДНК чередуются четырехнитчатая и двухнитчатая структуры, причем основная единица, сохраняющаяся при редупликации, это — двойная спираль ДНК. Хотя природа воспроизведения молекул ДНК окончательно еще не выяснена, однако уже имеющиеся представления могут служить основой для расшифровки механизмов передачи информации.

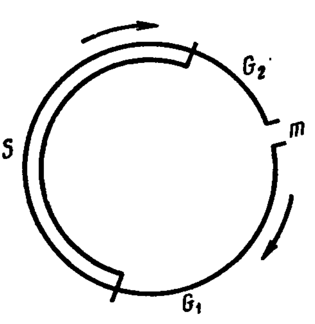


Рис. 141. Схема митотического цикла: m — митоз; G_1 — пресинтетический период; S — период синтеза ДНК; G_2 — премитотический период

В настоящее время установлено, что синтез ДНК происходит до наступления деления, в период интерфазы. Существуют видовые особенности протекания этого процесса. Например, показано, что у *tetrachymena* ДНК синтезируется на всем протяжении интерфазы, а у *paramecia* — преимущественно на заключительном ее этапе. Можно считать установленным, что во всех случаях синтез ДНК начинается в период интерфазы и заканчивается за определенный промежуток времени до следующего деления.

В последнее время в литературе время синтеза ДНК в клетке обозначается периодом S. Если весь митотический цикл схематически обозначить в виде круга (рис. 141), то интерфаза занимает наибольшую часть по сравнению с митозом. Период S занимает какую-то среднюю часть интерфазы и таким образом вся интерфаза делится на три периода: постмитотический период G_1, период синтеза S и премитотический период G_2.

Подготовка условий для синтеза ДНК в ядре (синтез трифосфатов четырех нуклеозидов, полимеразы и другие подготовительные реакции) происходит в пересинтетическом периоде (G_1).

В процессе клеточного деления этот период является весьма ответственным, так как подготовка синтеза ДНК требует правильного функционирования системы, генерирующей АТФ, четкой хронологической последовательности и координированности работы различных ферментативных систем. По-видимому, не

случайно, что период G_1 является наиболее чувствительным к изменениям условий внешней среды.

Синтез ДНК представляется основным явлением на пути к удвоению хромосом, но отнюдь не единственным. В настоящее время мы еще не располагаем данными в отношении удвоения многих других составных частей хромосом и не имеем возможности точно установить время полного завершения всего процесса воспроизведения. Кроме того, подготовка хромосом к митозу не сводится к одному только удвоению количества их вещества. Характерным является изменение форм хромосом в различных периодах митотического цикла. Во время интерфазы хромосомы достигают максимального размера, и к этому времени нити становятся чрезвычайно тонкими. Они приобретают зигзагообразную форму. Во время профазы каждая хромосома состоит из двух хроматид. К концу профазы появляется соматическая спираль и хромосома увеличивается в ширину, а на стадии метафазы хромосомы сокращаются до предела. Вслед за анофазой соматическая спираль раскручивается и во время следующего клеточного деления составляет остаточную спираль. Спирализация хромосом проходит от молекулярного до микроскопического уровня и при образовании сестринских единиц имеет место раскручивание их структуры.

Изменение строения хромосом, независимо от механизма их движения во время митоза, представляет собой приспособление для их транспортабельности.

Расхождение сестринских хромосом к противоположным полюсам осуществляется митотическим аппаратом, который состоит из хроматиновых и ахроматиновых структур. Хроматиновые компоненты состоят из хромосом, а ахроматиновые — из веретен и центриолей, иначе называемых полюсами деления. Недавно Мезия с сотрудниками впервые удалось изолировать митотический аппарат и исследовать химические и физические свойства этого сложного образования. Было показано, что митотический аппарат — структура временная, он появляется в клетке лишь тогда, когда клетка делится. В процессе деления он все время изменяется и исчезает по окончании деления. Все компоненты митотического аппарата взаимосвязаны между собой и составляют единую структуру.

Начальный акт митоза включает в себя расхождение центриолей или митотических центров, которые определяют полюса митоза, т. е. направления, по которым должны двигаться хромосомы в процессе деления. Митотические центры самовоспроизводят парные образования. Как правило, клетка наследует одну из этих пар и затем воспроизводит другую пару. Редубликация митотических центров предшествует удвоению хромосом, и таким образом, в период деления клетка имеет четыре митотических центра.

Наряду с удвоением митотических центров и хромосом подготовка к митозу включает также синтез веществ других частей митотического аппарата.

Поскольку митотический аппарат занимает значительную часть объема делящейся клетки, то можно предполагать, и это подтверждается экспериментально, что клетка строит нити веретена из веществ, уже имеющихся в ней перед делением. *В период интерфазы, по-видимому, происходит синтез специфических веществ, необходимых для образования веретена.* Образование митотического аппарата осуществляется, главным образом, деятельностью митотических центров. Когда центриоли оказываются на противоположных полюсах, их связывают между собой нити веретена, протягивающиеся от одного полюса к другому и к хромосомам. К этому времени хромосомы принимают нитевидную форму, удваиваются и передвигаются к экватору веретена. На этом заканчивается полное формирование митотического аппарата (профаза). Последующие стадии митоза: метафаза, анофаза и телофаза — характеризуются активной деятельностью митотического аппарата и движением хромосом. Начало самого митоза становится возможным после завершения основных подготовительных процессов. *Характерным признаком завершения подготовки к митозу является наступление так называемого «момента необратимости».* Это есть период, когда многочисленные факторы, могущие предотвратить митоз при воздействии до начала деления, уже не могут остановить его. Наступление момента необратимости прямо связано с накоплением определенного запаса энергии, после которого жизнь клетки становится мало зависимой от обменных реакций и может приступить к осуществлению самого деления. Давно было замечено, что обмен клетки в период деления не повышается. Более того, искусственное подавление дыхательных процессов во время самого деления не сказывается на течении данного деления, но задерживает наступление следующего. Так, в опытах Свана (M. Swann) на яйцах морского ежа было показано, что блокирование в течение определенного времени обмена веществ, вызывает задержку не текущего, а следующего деления. Следовательно, *энергия для митоза накапливается в клетке до наступления деления.* Потребность клетки в энергии для осуществления деления определяется синтезом макромолекулярных соединений, необходимых для удвоения клеточной массы, перестройки клеточных белков для формирования митотического аппарата, расхождения хромосом и делении клеточного тела, связанного с увеличением свободной поверхности.

Непосредственным энергетическим источником клеточного деления служит внутриклеточный синтез макроэргических соединений в виде АДФ и некоторых тиоловых эфиров, накопление которых также завершается к концу интерфазы.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТКИ

Процесс клеточного деления осуществляется всей клеткой. Очевидно, что проведение экспериментального анализа механизма этого явления представляет большую трудность. Любое правильное толкование физико-химического механизма клеточного деления должно отвечать на один важный вопрос: каким образом редублицирующиеся хромосомы распределяются между дочерними клетками?

Многочисленные экспериментальные данные косвенно или прямо свидетельствуют о том, что *все процессы митотического взаимодействия подчиняются обычным законам физики и химии.* В этом отношении большой интерес представляет исследование Эвенса и Сэведжа (H. Evans a. I. Cavage) по изучению скорости митоза в корнях конских бобов при различных температурных условиях. Они установили, что зависимость логарифма скорости митоза от обратной величины абсолютной температуры очень близка к линейной, что соответствует уравнению Аррениуса.

В первых работах по механизму митоза для объяснения привлекались относительно простые силы: электромагнитные силы, протоплазменные токи и т. п. Хотя в более поздних исследованиях эти представления не нашли своего дальнейшего развития, тем не менее до настоящего времени они еще не потеряли своего значения. Некоторые авторы особо отмечают роль электромагнитных сил в митотических движениях. Согласно этим представлениям, во время метафазы отрицательно заряженные хромосомы располагаются в экваториальной пластинке на равном расстоянии от полюсов вследствие своего отталкивания от обеих электроотрицательных центриолей. После исчезновения ядерной оболочки и при соприкосновении с цитоплазмой (электроположительной) хромосомы или их центромеры приобретают электроположительный заряд. В этих условиях претерпевшие деление хромосомы притягиваются к соответствующим полюсам, остающимися электроотрицательными. Многие наблюдения свидетельствуют о том, что митотические центры в начале митогенеза приводят в движение хромосомы, воздействуя на них сквозь ядерную оболочку.

Преимущество электромагнитной теории расхождения хромосом заключается в том, что она чрезвычайно просто описывает природу сил притяжения и отталкивания между хромосомами и митотическими центрами. Однако имеются другие экспериментальные данные, не подтверждающие электромагнитный механизм движения хромосом. Так, магнитные поля напряженностью от 30 до 40 000 *гаусс* не оказывали какого-нибудь влияния на течение митоза в корнях бобов, лука и в яйцах морского ежа. Исходя из результатов этих опытов, некоторые авторы полностью отрицают возможность участия электромагнитных сил в клеточном делении. Следует отметить, что в настоящее время трудно оценить

влияния внешнего магнитного поля на митоз, в выше приведенных опытах, так как еще неизвестны величины действующих магнитных сил в делящейся клетке. Кроме того, было бы ошибочно ожидать, что электромагнитная теория одна может дать удовлетворительное объяснение проблемы клеточного деления. По-видимому, электромагнитные силы — один из многих механизмов, действующих в этом процессе.

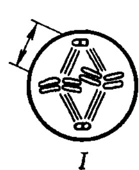
По мнению других исследователей, главным фактором в механике деления следует считать собственное движение определенной части хромосомы — центромеры. Действительно, во многих опытах было установлено, что фрагмент хромосомы, лишенный центромерной части, не может двигаться во время митоза. Кроме того, визуальные наблюдения над движениями хромосом в живых клетках создают впечатление, будто хромосомы пассивно следуют за смещениями своих центромер. Это особенно хорошо видно при наблюдении движения более крупных хромосом. Однако центромеру, по-видимому, нельзя рассматривать как элемент, обладающий собственной двигательной активностью. Это скорее точка приложения к хромосоме внешней силы, исходящей из взаимодействия центромера — веретена-центриоля.

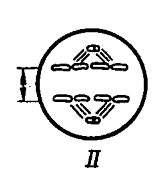
Изучение некоторых ненормальных митозов выдвинуло на первый план роль веретена. В отсутствие этого образования расщепленные хромосомы не расходятся по полюсам и остаются сгруппированными. Очевидно, механизм действия митотического аппарата в значительной степени обусловливается двигательной активностью веретена и специфичностью его молекулярного строения. Данные, полученные методом окрашивания и измерения спектра поглощения в УФ, указывают на то, что ахроматическая часть митотического аппарата состоит из высокомолекулярных частиц, главным образом белков. Основным физическим свойством этих структур является анизотропность, что дает основания считать митотический аппарат совокупностью систем ориентированных частиц.

Нити веретена по своему месту нахождения в митотическом аппарате разделяются на хромосомные, межзональные (в области между группами хромосом), непрерывные (тянущимися от полюса к полюсу) и асторальные лучи (идущие от митотических центров). Нити веретена не представляют собой прямых и непрерывных образований, а состоят из волоконец, соединенных между собой на всем своем протяжении. Согласно современным представлениям, внутренняя структура нитей состоит из парных фибрилл, т. е. субмикроскопических трубчатых элементов диаметром около 200 Å. Нити веретена следует рассматривать как реальную физическую систему, приводящую в движение удвоившиеся микроскопические структуры. Многочисленные наблюдения над делящимися клетками показывают, что расхождение митотических центров, которое служит началом митотического движения, обусловливает-

ся непосредственным участием в этом процессе отталкивающихся и тянущихся или сокращающихся нитей веретена.

Обычно контроль митотического аппарата над хромосомами появляется в метафазе, когда происходит точное распределение центров в одной плоскости посредине между полюсами (рис. 142, I). В этот период удвоившиеся хромосомы еще не разделены. Возможно, что расхождение хромосом в экваториальной плоскости на стадии метафазы является лишь необходимым следствием того обстоятельства, что перед тем как разъединиться и начать расходиться, хромосомы в течение некоторого времени находятся под





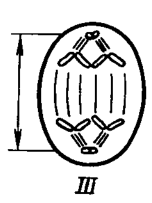


Рис. 142. Схема направлений действующих сил нитей веретена в митозе: I — расположение хромосом в экваториальной плоскости; II — расхождение сестринских хромосом; III — расхождение противоположных полюсов. Стрелками показано направление действующих сил веретена.

Объяснение см. в тексте

влиянием одновременно двух полюсов. Согласно представлению Эстергрена, (G. Oestergren) хромосомы попадают под влияние полюсов еще в начале митакинеза. Каждая хромосома притягивается по направлению к полюсу силой, величина которой зависит от первоначального расстояния от центромеры хромосомы до центриоли. Равновесие первоначально направленных сил, действующих на все еще спаренные сестринские центромеры, должно приводить хромосомы в экваториальное положение. Это продолжается до тех пор, пока не произойдет расщепления хромосом и тогда те же самые силы оттянут сестринские хромосомы к полюсам.

Действие веретена на межхромосомном участке по своему характеру может быть определено как тянущее. Хромосомы эластично деформируются этим тянущим действием, что хорошо можно видеть при их анофазном движении (рис. 142, II). Тянущая сила, по-видимому, способна действовать в различных направлениях на веретене, однако обычно она действует в направлении экваториальной пластинки.

Рост митотического аппарата, сопровождающий митоз, является одним из факторов, обеспечивающих расхождение хромосом. Важным проявлением этого «роста» является удлинение центрального веретена, приводящего к отталкиванию митотических

центров в противоположном направлении (рис. 142, III). Благодаря этим движениям расстояние между набором хромосом увеличивается, в то время как расстояние между каждым набором хромосом и ближайшим к нему центром уменьшается.

В отличие от метафазного движения в анофазном участвуют два типа движения: раздвижение хромосомных наборов при удалении митотических центров в результате удлинения центрального веретена и движение хромосом к собственным полюсам. В анофазном движении, по-видимому, действуют одновременно сократительные и отталкивающие силы.

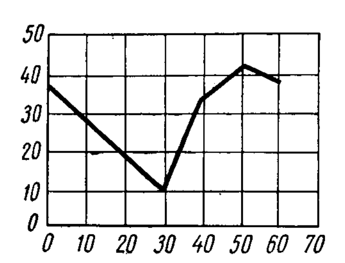


Рис. 143. Кривая изменения содержания свободного глутатиона в яйце морского ежа во время деления:

по оси абсцисс — время в минутах, по оси ординат — содержание глутатиона

Значительными процессами, имеющими прямое отношение к механизму клеточного деления, являются некоторые физические и химические изменения цитоплазмы делящейся клетки. Эти изменения неразрывно связаны с функциональной деятельностью митотического аппарата. Наиболее наглядным из этих процессов является изменение общего структурного состояния цитоплазмы, отражением которого служит изменение ее вязкости.

Различные методы определения внутриклеточной вязкости, например центрифугирование, метод седиментации цитоплазматических частиц, определения скорости передвижения частиц при броуновском движении и т. д. показали, что изменение вязкости цитоплазмы делящейся клетки носит циклический характер. В период, непосредственно предшествующий образованию метафазного веретена, общая вязкость резко повышается, во время метафазы — понижается. Если рассматривать делящуюся клетку как коллоидную систему, то высокая вязкость цитоплазмы перед делением и есть это проявление желатинизации, охватывающей всю клетку, по мере образования митотического аппарата протоплазма вновь разжижается. Желатинизация, или увеличение вязкости цитоплазмы, является результатом агрегации молекул в цепи и образования сети из таких цепей. Уменьшение вязкости цитоплазмы во время метафазы можно представить как результат разжижения геля. Предполагают, что митотическая желатинизация является начальной стадией полимеризации молекул, составляющих митотический аппарат, и последующее понижение вязкости обусловливается соединением молекулярных цепей в компактном образовании веретена митотического аппарата.

Растворимость различных элементов митотического аппарата при условии разрушения дисульфидных связей раскрывает механизм образования белковых мицел, как результат полимеризации

белков путем возникновения межмолекулярных S — S-связей. Поэтому физические свойства митотического аппарата должны соответствовать свойствам геля.

Участие S — S-связей в полимеризации хорошо согласуется со значительной ролью тиоловых соединений в клеточном делении. Рапкином (Z. Rapkin) было установлено, что на протяжении клеточного деления действует «глутатиновый» цикл, названный циклом Рапкина (рис. 143 и 144). Существование цикла Рапкина подтверждено и другими исследователями. Согласно имеющимся

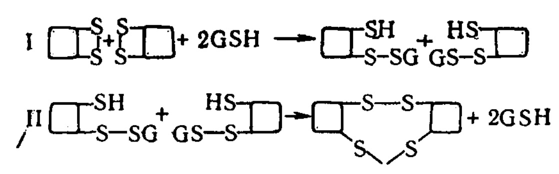


Рис. 144. Возможный механизм действия сульфгидрильных групп при образовании веретена: I — восстановление S—S-групп глутатионом; II — S—S-группы образуются вновь в качестве межмолекулярных связей

данным, количество растворимых SH-групп уменьшается приблизительно до метафазы, а затем вновь возрастает по мере дальнейшего хода деления. На основании этого была выдвинута гипотеза, объясняющая молекулярный механизм участия SH-групп в физико-химических изменениях делящейся клетки. Согласно этой гипотезе, полимеризация при гелеобразовании осуществляется превращением внутримолекулярных S — S-связей в белковом мономере в межмолекулярные S — S-связи полимера. Имеется также ряд экспериментальных данных, показывающих участие в образовании митотического аппарата водородных связей, роль вандерваальсовых сил, а также роль реакции внутриклеточной среды.

Молекулярные реакции, лежащие в основе митотического гелеобразования, следует рассматривать не только как процессы, приводящие к образованию структурных агрегатов митотического аппарата, но и как механизмы, в некоторой степени осуществляющие его функции. Достаточно отметить, что в процессе митоза разделение дочерних хромосом сопровождается значительными изменениями размера и геометрической формы митотического аппарата. Направленность этих изменений и обусловливает разделение хромосомных структур и клетки в целом. Нет сомнений, что физико-химический механизм митотического деления заключен именно в межмолекулярных силах структурных элементов митотического аппарата.

Из всех имеющихся видов взаимодействий белковых молекул для процессов деления клетки особое значение имеют специфиче-

ские взаимодействия, в результате которых молекулярные группы оказываются в определенных положениях и определенным образом ориентированными друг относительно друга.

Известно, что многие белки в растворе при определенных условиях, создающих возможности взаимодействий между молекулами, претерпевают глобулярно-фибриллярное превращение, причем диаметр образовавшихся фибрилл в модельных системах полностью совпадает с диаметром фибрилл, входящих в состав митотического аппарата. Примером является взаимодействие молекул инсулина. Установлено, что в определенных условиях внешней среды (pH, ионной силы и др.) можно наблюдать спонтанное образование системы фибрилл, имеющих диаметр 200 Å и длину в несколько тысяч ангстрем. Реакция ассоциации идет обычно до конца и обратимо, причем сама молекула инсулина при этом не претерпевает значительного развертывания.

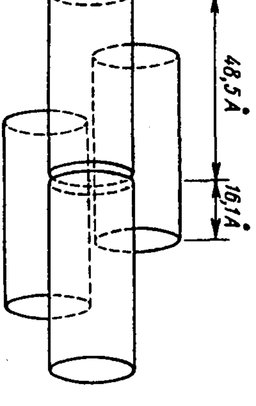


Рис. 145. Схема центрообразования фибрилл, иллюстрирующая кооперативное взаимодействие

Изучение кинетических закономерностей превращения инсулина из глобулярной формы в фибриллярную показало, что центр образования фибрилл возникает в результате кооперативных эффектов взаимодействия между несколькими основными молекулярными единицами согласно уравнению

$$\frac{dn}{dt} = kc^p, \qquad (13.2)$$

где $\frac{dn}{dt}$ — скорость возникновения центров образования фибрилл,
k — константа скорости реакции,
c — концентрация инсулина,
p — число молекулярных единиц, приблизительно равное 3.

После начала реакции, когда фибриллы достигают определенного размера, дальнейший рост зависит от площади их поверхности и концентрации свободных молекул. Сам кооперативный эффект оказывает направленное действие при росте фибрилл. На рис. 145 показано возможное расположение центров образования фибрилл из молекул инсулина. Дополнительные молекулярные единицы присоединяются так, что уже образовавшаяся структура не нарушается; вследствие этого образование будет удлиняться в направлении длинных осей цилиндров.

Глобулярно-фибриллярные превращения являются естественными молекулярными процессами, лежащими в основе направленного удлинения нитей веретена, и таким образом, обусловливающими митотические движения. В делящейся клетке центрами образования фибрилл веретена служат, по-видимому, митотические

центры и центромеры хромосом. Так, Беллар при воздействии гипертоническим раствором на сперматоцит кузнечика наблюдал чрезмерное удлинение нитей веретена, выталкивающих митотические центры за пределы клетки. Отталкивающая сила в этом движении исходила от астральных лучей, т. е. нитей, растущих из центров. Некоторые из них вскоре становятся достаточно длинными, чтобы растущие из одной центриоли могли встретиться с растущими из другой. Встретившись, они продолжают расти, образуя центральное веретено. Имеются все основания полагать, что веретено обладает достаточной твердостью, чтобы раздвигать набор хромосом. Следует отметить, что направленность и размерность роста нитей веретена и соответственно движение митотических центров и хромосом в нормально делящейся клетке строго ограничены и находятся под контролем клетки. Для нитей веретена характерно также свойство сокращения. Особенно оно присуще хромосомным нитям веретена, которые обусловливают один из типов анофазного движения. Гоффман-Берлинг и Вебер (H. Hoffman-Berling a. H. Weber) применяли технику глицериновой экстракции, предложенной Сент-Дьердьи для мышц, к фибробластам и обнаружили, что последние сокращаются при тех условиях, что и мышечное волокно. Однако в химическом отношении белки, выделенные из изолированного митотического аппарата, не обнаруживают сходства с актомиозином. Гоффман-Берлинг считает, что сократимость, по-видимому, может быть присуща не только актомиозину, но и другим белкам, в том числе и белку митотического аппарата. Нужно заметить, что значение сократительных движений по сравнению с отталкивающими в процессе митоза незначительно и во многих случаях трудно обнаруживается.

Как только хромосомы разделяются на две группы, начинается образование двух интерфазных ядер, т. е. возникновение ядерной оболочки и тонких вытянутых хромосом. Этот период характеризуется значительным увеличением массы в межзональном пространстве, восстановлением ядрышек, исчезновением митотического аппарата и делением клетки на две дочерние.

Процесс перемещения хромосом к полюсам и деление всей остальной части клетки (цитогенез), хотя и не зависят друг от друга, но и в последнем процессе решающая роль принадлежит веретену и центрам митоза. Установлено, что удлинение клетки во время митоза сопровождается ее сжатием в области экватора. Некоторые нити веретена к моменту полного развития митотического аппарата прикрепляются к поверхности клеток и пересекаются в области экватора. Движущей силой является удлинение центрального веретена, что вызывает сближение пересекающихся в области экватора концов нитей, идущих от центров, и приводит к образованию борозды деления. Значительную роль в этом процессе играют астральные лучи, приводящие к структур-

ным перестройкам кортекса в области двух полюсов. Известно, что под влиянием астральных лучей в структуре клеточной оболочки между полюсами и экватором происходит определенная дифференцировка, создающая градиенты pH, Ca^{2+}, АТФ, белков и липидов. Механизм цитогенеза разнообразен и сравнительно мало изучен. Во многих животных клетках четко наблюдается образование борозды деления, а в некоторых случаях, например, в амебовидных клетках или фибробластах, дочерние клетки стремятся разойтись и разрывают тяж, возникающий между ними. В растительных клетках обычно разделение заканчивается появлением между двумя ядрами перегородки.

Чрезмерное разнообразие внешнего проявления митотических процессов и отдельных этапов митоза, встречающихся в природе, породило многочисленные разнообразные и противоречивые представления о механизме клеточного деления. Пока очень трудно объединить все имеющиеся факты в единую систему. Самый поверхностный просмотр этих фактов свидетельствует о большой сложности процесса клеточного деления. Нет сомнений, что наиболее общие закономерности этого явления заключены в самих молекулярных структурах клетки и физико-химическое взаимодействие между ними является основным механизмом, обеспечивающим преемственность жизни клетки. Решающие исследования в этом направлении в наше время только начинаются.

ГЛАВА XIV

АВТОРЕГУЛИРОВАНИЕ

Энергетические процессы в клетках и организмах осуществляются сложными циклами химических превращений. Биологическая система может существовать и нормально развиваться только при условии строгого координирования развивающихся в ней реакций.

Жизнь клеток, как известно, тесно связана с внешней средой и ее физическими условиями. Существуют пределы вариаций условий (температуры, осмотических условий, влажности и т. д.), в которых возможен жизненный процесс. Эти пределы определяются способностью авторегуляторных механизмов осуществлять координацию биореакций при изменениях факторов внешней среды, т. е. сохранять в некоторых границах независимость организма. Многие низшие организмы могут существовать и сохраняют способность к размножению в очень широких диапазонах температур, осмотических условий и состава среды.

По мере усложнения в ходе эволюции клетки становятся более требовательными к условиям внешней среды и координация физико-химических процессов у них нарушается уже при незначительных изменениях pH, солевого состава среды, температуры. Это приводит к возникновению в организмах приспособлений, обеспечивающих авторегуляцию.

НАДЕЖНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Для анализа механизмов авторегулирования в живых клетках большое значение имеет привлечение в биологию методов и подходов кибернетики.

К и б е р н е т и к а — наука о законах связи, управлении и контроле в различных механизмах. Кибернетические понятия могут быть распространены и на живые системы. Применение аппарата кибернетики облегчает систематизацию, моделирование, понимание общих схем и механизмов авторегулирования живых организмов.

Аппарат кибернетики может быть привлечен, например, для анализа схем управления высшей нервной деятельности; для анализа систем и процессов регулирования химических реакций,

в частности, и в живых клетках. Наиболее применимы для анализа авторегуляторных механизмов в биологических системах разделы кибернетики, изучающие саморегулирующиеся системы. В этих системах авторегулирование осуществляется обратной связью, т. е. при отклонении системы от оптимального режима возникают или усиливаются сигналы, которые создают условия для возврата к исходному уровню.

Основной ценностью применения кибернетических методов для анализа процессов, протекающих в биологических объектах, является то, что с их помощью можно количественно подходить к оценке надежности системы. Способность биологических систем приспосабливаться в большей или меньшей степени к изменениям внешней среды определяется степенью надежности авторегуляторных систем организмов и может рассматриваться в свете теории надежности.

В кибернетике под надежностью системы понимают вероятность того, что какой-либо элемент электронной схемы может выйти из строя. Эта вероятность будет, естественно, возрастать с увеличением количества элементов схемы. Принято обратную величину, вероятность безотказной работы, принимать за меру надежности системы:

$$M/Q, \tag{14.1}$$

где M — количество элементов каждого вида,

Q — степень вероятности безотказной работы.

В общем виде метод оценки надежности сложных схем этим приемом может быть применен и для оценки надежности биологических систем. Действительно, в широком эволюционном биологическом аспекте выявляется принцип, что чем сложнее построены клетки и биологические системы, тем более стабильных внешних условий (температурных, осмотических и т. п.) они требуют, и тем скорее выходят из строя при изменении внешних условий.

Из уравнения (14.1) следует, что с возрастанием количества элементов надежность устройства в целом уменьшается, поэтому для безотказной работы при усложнении устройства нужно повышать его Q.

Повышение надежности систем в общем обеспечивается наличием резервных деталей (в биологии — регенерацией), т. е. функцию выпавшего (поврежденного) элемента берет на себя другой элемент.

Общий принцип теории надежности, согласно которому с возрастанием количества элементов в схеме ее надежность уменьшается, вполне подходит к биологическим системам. Клетки высших организмов являются менее устойчивыми по отношению к изменениям условий среды, чем клетки, стоящие на более низком уровне развития. В то же время высшие организмы в целом устойчивее, чем простейшие. Это результат того, что наряду с возра-

станием числа элементов происходит усовершенствование авторегуляторных механизмов. Например, у низших холоднокровных животных при изменении температуры происходит только изменение интенсивности обменных реакций и на всех этих уровнях в пределах возможности существования жизни может устанавливаться стационарное состояние. У теплокровных незначительное изменение температуры организма вызывает полное расстройство координации реакций и гибель; но в то же время теплокровные животные легко переносят очень большое колебание температуры внешней среды. Это возможно потому, что весьма совершенные авторегуляторные механизмы поддерживают температуру внутренней среды организма на постоянном уровне.

Второй принцип теории надежности устанавливает связь между надежностью и скоростями процессов. В общей форме установлено, что с возрастанием скорости процессов надежность систем падает. Эта связь описывается нелинейными функциями и существуют критические значения скоростей, при которых надежность резко падает.

Эта зависимость хорошо проявляется и при биологических процессах. Действительно, факторы, ускоряющие протекание реакций в биологических системах, например повышение температуры, приводят к возникновению тяжелых нарушений и гибели вследствие нарушения стационарного состояния.

МЕХАНИЗМЫ АВТОРЕГУЛЯЦИИ

Системы живых клеток располагают арсеналом физико-химических механизмов, которые позволяют регулировать скорости реакций и их координацию.

В первую очередь, эти механизмы связаны с особенностями физико-химических клеточных структур.

Степень надежности клеток, в основном, определяется прочностью и стабильностью материалов, из которых построены клеточные структуры. И с надежностью этих элементов в значительной мере связана возможность координации химических обменных реакций.

В конкретных механизмах регулирования стационарного состояния в клетках большую роль играют особенности их строения. Так, клеточные оболочки и фазы могут изменять в некоторых пределах скорость диффузии. Например, электрические потенциалы, которые существуют на границах фаз, могут вызывать ускорение или замедление перемещения заряженных молекул и направлять их движение против градиента концентраций. Природа поверхности клеток позволяет изменять скорости проникновения в клетки различных веществ в силу их молекулярных размеров или растворимости. Скорости проникновения будут

влиять на скорости реакций и способствовать установлению стационарного состояния на определенном уровне. Большую роль в механизмах авторегулирования уровней обменных процессов в клетках играют химические ингибиторы и актиоваторы. Наибольшая роль при этом принадлежит группе антиокислителей, которые могут удерживать на определенном стационарном уровне окислительные процессы.

В связи с тем, что механизмы авторегулирования химических процессов в клетках связаны со структурными элементами, в первую очередь следует поставить вопрос о надежности именно этих структур. Уже давно выдвигалось, например, положение, что наиболее повреждающими факторами являются те, которые непосредственно разрушают структурные элементы. Группа токсических агентов, оказывающих такое действие, получила название протоплазматических ядов. Структурные элементы построены из белков, нуклеиновых кислот и липидов и их комплексов. Они находятся в определенном агрегатном состоянии, которое нарушается, если входящие в комплекс соединения изменяют свои свойства в результате химических реакций. Между тем соединения, из которых построены структуры клеток, в большей или меньшей мере всегда являются химически реакционно способными и могут вступать в реакцию с различными радикалами и химически активными веществами, которые возникают в клетках с активным обменом веществ.

В связи с этим в клетках возникают физико-химические механизмы, которые вызывают снижение реакционной способности и повышение надежности биохимических субстратов, из которых построены клетки. Это достигается особенностями структур и присутствием ингибиторов.

Большую роль в надежности играет комплексообразование. При возникновении структурных комплексов слабые связи могут менять химическую реактивность входящих в комплекс компонентов. Так в химии давно известно, что появление водородных связей в комплексах может изменять реактивность как в отношении ее повышения, так и понижения. Например известно, что в сложных органических соединениях наблюдается процесс циклизации, когда возникает реакция между частями молекул и возникают новые циклы. Однако если эти участки молекул зафиксированы на далеком расстоянии кольцом водородных связей, то циклизация становится невозможной и это повышает прочность системы.

При разрушении этих слабых связей реакционная способность резко возрастает. Это, по-видимому, должно играть большую роль в клетках, например, при действии повреждающих факторов. Вообще в живых клетках в норме надежность биологических структур очень велика. Однако когда появляется какое-либо повреждающее воздействие, начинается очень быстро развивающееся с автоускорением разложение компонентов биологи-

ческих структур. Ареактивный белок начинает быстро разлагаться в процессе автолиза, происходит интенсивное самопроизвольное окисление липидов, совершенно несвойственное живым клеткам. Малореактивные в состоянии комплекса компоненты с нарушением его становятся реактивными, и это приводит иногда к полному цитолизу клеток.

Наибольшую опасность для структурных элементов представляют побочные реакции окисления, не связанные основным дыхательным циклом. Сравнительное изучение реакционной способности различных структурных элементов показывает, что нуклеиновые кислоты и белки обладают сравнительно высокой стабильностью и самопроизвольные реакции, например окисления, в них не возникают. Правда, описаны перекиси этих веществ, которые были обнаружены при облучении их ионизирующей радиацией. Однако эти соединения образуются в условиях организма с трудом, и квантовый выход их невелик.

Напротив, липидные вещества являются сравнительно легко окисляемыми и в них легко возникают цепные реакции окисления. В присутствии кислорода и других активных продуктов в липидах возникают гидроперекиси и — на первом этапе — гидроперекисные радикалы.

Липиды играют, как известно, первостепенную роль в структурных элементах мембран (в митохондриях, лизосомах), образуя комплексы с протеинами (липопротеины, фосфолипиды), и являются основой, по которой происходит транспорт электронов между ферментами в дыхательной цепи. Поэтому уже давно высказывались предположения, что именно липопротеиновые комплексы являются наиболее уязвимым местом, определяющим, в основном, надежность функционирования клеток.

Гидроперекиси образуются в липидах в присутствии кислорода самопроизвольно. Их образование ускоряется действием света, УФ, ионизирующих излучений и может индуцироваться радикалами и перекисью водорода. В связи с этим липидные структуры клеток были бы очень нестойкими, если бы они не были защищены ингибиторами. Основную роль в стабилизации и уменьшении реакционной способности липидных структур играют ингибиторы окисления — антиокислители. Роль этих антиокислителей заключается в том, что они непосредственно реагируют с окислительными радикалами и гидроперекисями, индуцируемыми внешними факторами и возникающими как промежуточные продукты при развитии реакции. Этим они уменьшают концентрацию активных продуктов, а следовательно, и скорость реакции. Реакция при этом полностью не приостанавливается, но развитие ее замедляется. Эти процессы были изучены хорошо на углеводородах. При этом, конечно, происходит расходование ингибитора.

При наличии достаточного количества ингибитора скорость реакции будет стационарной. При уменьшении количества анти-

окислителя вследствие его расходования, начиная с некоторого момента происходит довольно быстрый переход из режима стационарного в режим нестационарный, когда реакция начинает развиваться во времени с самоускорением. Это происходит тогда, когда возрастает вероятность возникновения цепей по отношению к вероятности их обрыва. В случае же, если расход антиокислителей восполняется их поступлением, осуществляется стационарное равновесие.

В клетках живых организмов непрерывно развивается стационарный процесс окисления структурных биолипидов. В ряде исследований было установлено, что в вытяжках липидов из растительных и животных тканей химическими методами всегда можно обнаружить антиоксиданты, а также такие активные продукты, как гидроперекиси. Количество их очень незначительно, но очень постоянно. Наличие в биолипидах таких активных продуктов говорит о том, что в норме в биолипидах, и особенно в структурных липидах, развивается очень медленная реакция окисления.

Для того чтобы удержать реакцию на стационарном уровне, авторегуляторные механизмы должны обеспечивать непрерывное восстановление антиоксидантов, или за счет непрерывного потока из внешней среды, или за счет синтеза. В результате должно возникнуть стационарное состояние равенства потоков расходования антиоксиданта и его поступления. Если в результате действия какого-либо фактора, например повышения температуры, происходит усиленный распад антиоксидантов, механизм авторегулирования не сможет обеспечить восполнение и это приводит к нестационарному развитию реакции.

Ускорение разрушения антиокислителя и переход системы в нестационарный режим происходит при ускорении реакции окисления, при действии, например, ионизирующих излучений, когда увеличивается количество окислительных радикалов. По своей природе окислительная реакция, развивающаяся в биолипидах, является цепной реакцией, но в условиях стационарного режима она имеет параметры реакции нулевого порядка. Для обеспечения сохранности структур необходима подача свободной энергии. Эту энергию — очень незначительную — можно считать структурной энергией, о которой давно стоит вопрос в термодинамике.

Поддержание реакции самоокисления структурных липидов на низком уровне является одной из авторегулируемых систем организма. Роль этого механизма очень велика, так как окисление структурных липидов вызывает разрыв связей между липидами и протеинами в липопротеиновых комплексах.

Антиокислители являются очень распространенной группой природных веществ. Они обнаруживаются во всех биологических клетках и тканях. Было показано, что экстракты тканей различ-

ных животных и растительных организмов обладают способностью тормозить окислительные реакции in vitro. Много исследований было проведено по изучению способности эфирных и спиртовых вытяжек из клеток и тканей тормозить окисление олеиновой кислоты. В других структурированных системах имеются также принципиально важные механизмы, но построенные на других химических реакциях.

Кроме антиокислителей, имеется в клетках ряд других ингибиторов и их антагонистов — ускорителей, которые регулируют скорости реакций и образуются в ходе реакций.

СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ

Как известно живые клетки, с точки зрения термодинамики, являются открытыми системами. Основное условие для нормальной работы этих систем — это наличие стационарного равновесия, которое описывается уравнением Пригожина (см. стр. 41), где энергетическое равновесие определяется суммой двух противоположно направленных потоков — потока положительной энтропии, направленной из клеток во внешнюю среду, и потока отрицательной энтропии, направленного из внешней среды в клетки. Первый поток — это деградированные вещества, выводимые выделительными системами, как CO_2, мочевина, пурины и т. д. Второй поток — это вещества, содержащие свободную энергию.

Основным условием нормального функционирования клеток является равенство этих двух потоков, при котором положительная энтропия не нарастает в клетках. Всякое нарушение в авторегуляции, которое приводит к накоплению положительной энтропии, оказывается вредным для клеток и ведет к развитию патологических процессов и гибели системы.

В общей форме можно считать, что основной функцией авторегуляционных приспособлений является регулирование скоростей реакций в клетках так, чтобы оба потока были равны, и установлением скоростей процессов на наиболее выгодном для данных условий уровне.

Реально это сводится к регулированию диффузионных потоков. Выведение продуктов из клеток и поступление их в клетки происходит за счет диффузии. Скорости переноса определяются в соответствии со вторым законом термодинамики — градиентом концентраций, согласно закону Фика (см. стр. 161). Поэтому авторегуляция должна непрерывно поддерживать концентрационный градиент. Например, поступление кислорода в клетку при дыхании происходит вследствие наличия постоянного градиента концентрации кислорода. Этот градиент может существовать только при потреблении кислорода окислительными реакциями. Ско-

рость диффузии кислорода в клетки будет определяться скоростью потребляющей его окислительной реакции, а скорость последней — по закону действия масс — в свою очередь определяется концентрацией продуктов этой реакции, т. е. накоплением CO_2. Ухудшение вывода CO_2 будет замедлять реакцию окисления и соответственно снижать градиент по кислороду.

Повышение концентрации продуктов реакции замедляет реакцию и тормозит поступление веществ у клетки — это пример обратной связи, которая представляется основным принципом клеточного авторегулирования.

Необходимостью создания оптимальных условий для поддержания стационарного состояния на наиболее выгодном уровне определяются и геометрические размеры клеток. Это связано с тем, что скорость диффузионного переноса зависит от отношения поверхности клетки к ее объему. С возрастанием объема относительная поверхность уменьшается, т. е. уменьшается количество вещества, переносимого на единицу объема. Поэтому с увеличением геометрического размера клеток ухудшаются условия снабжения, стационарный уровень оказывается низким и не может быть поднят. Неоднократно отмечалось, что клеточные элементы организмов, у которых стационарное равновесие устанавливается на более высоком уровне, имеют геометрические размеры меньшие, чем у организмов, имеющих низкий стационарный энергетический порог. Всякое увеличение объема за пределы, характерные для данного типа обмена веществ, будет вести к накоплению положительной энтропии.

Таким образом, взаимосвязь процессов диффузии и скорость реакции определяют условия, при которых стационарность устанавливается на наиболее выгодном энергетическом уровне и при котором выделение положительной энтропии на единицу массы является минимальным. Верхний предел скорости реакции лимитируется возможностями отвода продуктов реакции. Нижний предел лимитируется концентрацией веществ, поставляющих свободную энергию в клетки.

Однако на эти простые механизмы накладываются уже специализированные авторегуляторные приспособления. В первую очередь, это мембраны, которые могут регулировать и изменять скорость диффузии. Это достигается структурными особенностями мембран, размерами пор, наличием электрических потенциалов, сорбционными особенностями.

Авторегулирующие механизмы клеточных процессов могут удерживать стационарное состояние только в некоторых пределах и этим определяются физические условия — границы возможности существования жизни в зависимости от температуры, газового состава, концентраций веществ и т. д. Этим определяется также положение биологического оптимума, при котором достигается наиболее выгодный уровень стационарного состояния.

Возможностью возникновения стационарного состояния определяется возможность биологической адаптации к необычным для клетки внешним условиям. Основным механизмом этой авторегуляции являются термодинамические и кинетические свойства химических систем.

АДАПТАЦИЯ К ВНЕШНИМ УСЛОВИЯМ

Пределы изменений внешней среды (температуры, осмотических условий, наличия воды и т. д.), при которых клетки и организмы способны существовать, определяются возможностями клеток устанавливать стационарное равновесие при данных условиях.

Этим определяются температурные границы жизни и определяются те различия по теплоустойчивости и морозоустойчивости, которые существуют у растений. В каких-то пределах стационарное состояние устанавливается надежно, но эта надежность резко падает в критических точках как при понижении, так и при повышении температуры.

Что является «узким местом», которое ограничивает надежность существования стационарного равновесия? Это, в первую очередь, сохранность липопротеиновых структур. Уже давно было обращено внимание на то, что у растений число двойных связей (насыщенность) в липидах, из которых построены их мембранные структурные элементы, закономерно возрастает от более южных форм к северным (закон Иванова). Это говорит о том, что реакционная способность структурных липидов понижается по мере повышения теплолюбивости растений. Липопротеиновые комплексы являются субстратом, связывающим ферментные системы,— они играют огромную роль в авторегулировании химических процессов в клетках. Надежность существования этого комплекса обеспечивается ингибиторами-антиокислителями, которые снижают реакционную способность, однако полностью подавить процесс окисления антиоксиданты не могут. Подавление окислительной реакционной способности полностью невозможно вследствие того, что липидные-фосфолипидные фазы являются субстратом важнейшего процесса переброски электронов между ферментами. Поэтому в этом комплексе должна поддерживаться для нормального функционирования ферментных систем некоторая стационарная окислительная активность. Сейчас предполагается, что этот оптимальный уровень окислительной активности в липидных фазах удерживается равновесием липидных антиоксидантов токоферолов (витамин Е) и их антагонистом — витамином А. Поэтому необходим непрерывный поток этих веществ для поддержания стационарного равновесия.

Разрушение липопротеиновых комплексов является очень часто первопричиной нарушения авторегуляции при действии различных повреждающих факторов. С нарушением липопротеиновых

комплексов связано, как указывалось, например, лучевое поражение ультрафиолетом. Эти излучения активируют окислительные реакции, вызывают (индуцируют) реакции цепного типа, при которых происходит усиленный распад ингибиторов. Если их приток не может восполнить расход, то течение реакции становится нестационарным — развивается с ускорением — и приводит к разрушению системы электронного переноса, что затем нарушает и всю систему авторегулирования в клетках. С разрушением липопротеинового комплекса связано также действие очень многих токсических веществ (иприты, абрин, рицинбактериальные экзотоксины).

Это же узкое звено определяет пределы существования организма при изменении не только температуры, но и минерального ионного состава среды, осмотических условий, влажности и т. д. Способность адаптироваться и широта этой адаптации связана с прочностью этого звена. Сейчас в различных областях биологии накапливается все больше и больше данных о том, что организмы, обладающие широкими адаптационными возможностями, обладают более мощными антиокислительными системами.

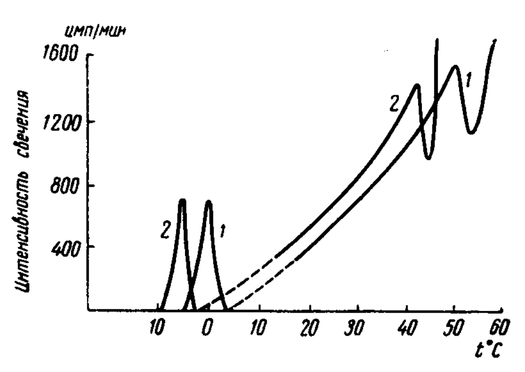


Рис. 146. Зависимость хемилюминесценции корней пшеницы от температуры: *1* — пшеница Азербайджана; *2* — пшеница севера РСФСР

Развитие биофизических методов получения информации о физико-химических процессах, протекающих в живых клетках, позволило подвергнуть количественному анализу состояние и целостность липопротеиновых элементов клеточной структуры. В последнее время с помощью высокочувствительных фотоумножительных установок было обнаружено, что все живые клетки испускают спонтанно сверхслабое свечение (100—2000 *кв/см*^{2}) в видимой области спектра. Это свечение испускается, в основном, при слабом окислении липидов структурных элементов. Всякое повреждение этих структур вызывается усиленным окислением липидного комплекса и сопровождается усиленной хемолюминесценцией. Это, по терминологии старых авторов, деградационное излучение (В. В. Лепешкин), информирующее о разрушении структур, нарушении стационарности и гибели клеток.

При регистрации этого излучения современными точными фотоумножительными установками удается четко засечь критические точки, в которых происходит разрушение авторегуляторных механизмов. На рис. 146 дана диаграмма интенсивности собствен-

ного свечения корней пшениц из различных климатических зон в зависимости от температуры. При повышении температуры интенсивность свечения повышается, но стационарность еще сохраняется. Однако в двух точках как при повышении температуры (+37—45° С), так и при понижении ее (0—7° С) возникает деградационная вспышка. После этих вспышек обратимость при возврате к исходной температуре невозможна, и стационарность не устанавливается. Положение этих деградационных вспышек на температурной оси связано, по-видимому, с теплолюбивостью и холодоустойчивостью растений.

Подобная зависимость была отмечена при сравнительном изучении антиокислительных систем и способности водных организмов переходить из морской воды в пресную и наоборот. При переходе живого организма из одних осмотических условий в другие происходит интенсивное повышение окислительных процессов, которые дают энергию для работы против осмотических сил и поддержания солевых градиентов. Однако при таком повышенном окислении происходит усиленный расход антиоксидантов и, когда их количество падает ниже некоторого уровня, стационарные процессы могут перейти в нестационарное развитие, и, следовательно, наступит гибель.

В связи с этим отмечено, что в клетках организмов, способных выдерживать сильные осмотические перепады, антиокислительные системы более мощные, нежели у тех организмов (стеногалинных), которые не выдерживают осмотических колебаний.

Одним из наиболее показательных примеров представляется непроницаемость мембран митохондриальных структур для пиридиннуклеотида (НАД). Митохондрии не могут окислять $НАДН_2$, если он добавляется к ним извне, но активно окисляют внутренний $НАДН_2$, который в них. Проникновение внутрь митохондрий тироксина Ca^{2+}, повышая проницаемость мембран, позволяет выйти внутримитохондриальному НАД наружу. Структурная изоляция является существенным фактором в регулировании.

В настоящее время выявляется и описывается много частных биохимических механизмов, которые обеспечивают авторегулирование реакций в биологических системах. Особенное внимание привлекают сейчас физико-химические механизмы, которыми также балансируется стационарность в химическом дыхательном цикле.

В результате работ Чанса (B. Chance) и сотрудников было показано, что поглощение кислорода митохондриями функционально связано с концентрацией аденозиндифосфата (АДФ).

Был также проанализирован эффект повышения окислительной активности дрожжей при прибавлении глюкозы и установлено, что это повышение связано с образованием АДФ:

$$\text{Глюкоза} + \text{АТФ} \longrightarrow \text{Глюкоза-6-фосфат} + \text{АДФ}.$$

В обратном направлении действует АТФ, поэтому авторегуляция клеточного дыхания регулируется отношением АТФ/АДФ. Большую роль в этих процессах играют липиды.

Помимо ингибиторов и стимуляторов, роль факторов, обеспечивающих регулирование скорости химических превращений, играют электрические потенциалы. Благодаря действию электрических сил происходит перемещение, например, органоидов клеток — митохондрий, лизосом, микрозом, несущих системы ферментов, к точкам, которые нуждаются в повышенной синтетической активности. Например, известно, что при регенерации клеточных повреждений эти органеллы сосредоточиваются в местах, где происходит репарация. В ряде исследований показано, что это перемещение осуществляется за счет возникновения разностей потенциалов.

Интересный случай авторегулирования расшифрован в листьях растений. Как известно, интенсивность фотосинтеза в листьях растет с возрастанием светового потока до некоторого максимума, после которого наступает обратный процесс ослабления фотосинтеза. Однако растения могут регулировать в известных пределах интенсивность воспринимаемого светового потока и удерживать его на некотором оптимальном уровне. В листе, в поверхностной части, имеются клетки палисадной паренхимы, в которых содержится большое количество хлоропластов. Было установлено однако, что максимальная фотосинтетическая активность сосредоточена не в этом слое, а ниже в слоях рыхлой паренхимы, клетки же палисадной паренхимы выполняют роль дифференциального светофильтра. При слабом освещении хлоропласты расположены вдоль вертикальных стенок клеток и свет свободно проходит через прозрачную цитоплазму. При усилении света хлоропласты начинают перемещаться в нижнюю часть клеток и при этом сорбционная способность клеток возрастает. Благодаря этому поддерживается в оптимальной зоне световой режим фотосинтеза для нижележащих клеток, и коэффициент полезного действия во время светового дня повышается.

Живые клетки, как известно, обладают способностью очень стабильно поддерживать свой ионный состав. Небольшие же сдвиги этого состава приводят к патологии и к гибели клеток. Основным свойством клеток является способность удерживать высокую концентрацию калия при низкой его концентрации в среде. Раньше предполагали, что эта регуляция целиком определяется способностью мембраны клеток избирательно пропускать различные ионы и, в частности, пропускать калий и не пропускать натрий. Однако подтверждение этого предположения встретило большие трудности. В настоящее время имеются попытки объяснять избирательное сродство клеток к калию тем, что составные части протоплазмы являются полимерами ионитами, т. е. по своим свойствам аналогичны ионообменным смолам. Известны катиониты,

которые могут избирательно сорбировать некоторые ионы. Известны и иониты с некоторой избирательностью именно по отношению к калию.

Избирательность этих ионитов объясняется тем, что в структуре катионита имеются анионные группы, образующие с данным ионом комплексные и трудно растворимые соединения. Например, таким избирательным по отношению к калию катионитом является смола, содержащая дипикриламинные группы. С этой точки зрения изменения количеств связанного калия, которое наблюдается, например, при мышечном сокращении и нервном возбуждении и приводит к выходу ионов калия из клеток, обусловлено конформационными изменениями полиэлектролитов. При этом изменяется распределение электростатических зарядов на их поверхности. Имеется много экспериментальных наблюдений, которые говорят, что при физиологической активности клеток происходят такие структурные изменения.

Многочисленные биологические наблюдения над изменениями вязкости протоплазмы уже давно говорят о том, что протоплазма клеток в состоянии покоя является золем. Это было обнаружено методом изучения скорости броуновского движения. Вязкость протоплазмы в покое такого же порядка, как и у воды. Это было показано для клеток амеб, крупных растительных клеток, мышечных волокон и т. д. Однако при переходе из состояния покоя в состояние активности, как правило, в протоплазме происходит гелеобразование, т. е. затвердевание протоплазмы. Это сопровождается повышением «проницаемости калия»— наблюдается выхождение калия из клетки во внешнюю среду. Это явление имеет универсальный характер, его наблюдают при движениях амебоидных клеток, особенно хорошо оно выражено у миксомицетов, при сокращении мышечных фибрилл, при клеточном делении, при образовании веретена. Имеются данные о том, что структурообразование происходит при возбуждении нервных волокон (это обнаруживается по изменению их механических свойств). Важно отметить, что описанные явления обратимы.

Образования геля происходят в полиэлектролитных системах тогда, когда нити полимера разворачиваются и они приобретают электрическую полярность как на концах, так и вдоль нити полимерной молекулы. При этом силы взаимодействия, вызванные молекулами, находящимися в растворе, возрастают. Однако для того чтобы произошло гелеобразование, необходимо, чтобы концентрация золя достигла некоторого критического порога. При этом обычно гелеобразование происходит сразу.

На основании некоторых биологических наблюдений можно сделать заключение, что распад макроорганических соединений (АТФ и др.) может происходить только тогда, когда биополиэлектролит приобретает гелеобразную консистенцию. Поэтому становится понятным, почему гелеобразование при раздражении или

сокращении не может быть длительным. Это ведет к разрядке аккумулированной энергии и непроизводительной ее трате. Это, например, наблюдается при длительном тетанизирующем раздражении, во время которого наблюдается непрерывная отдача калия во внешний раствор.

Существование явной связи между гелеобразованием протоплазмы и выделением энергии заставляет предполагать, что в протоплазме имеется своеобразный механизм авторегулирования отдачи энергии на основе переходов из геля в золь и наоборот. Поэтому представляют значительный интерес выявления условий, при которых эти переходы осуществляются, и механизмов, обеспечивающих этот переход.

Известно, что основным условием перехода из состояния золя в гель является возможность возникновения поперечных связей или сил Ван-дер-Ваальса. Сейчас еще имеется очень мало информации о механической прочности гелей, которые образуются в протоплазме в активном состоянии. Однако есть основание предполагать, что обратимые гели обладают незначительной прочностью. По-видимому, так же, как и в неживых гелях, гели, возникающие в протоплазме, имеют сетчатое строение. Появление двойного лучепреломления на биогелях, образующихся, например, при делении клеток в зоне веретена, говорит о том, что здесь возникает некоторая ориентировка вытянутых нитевидных молекул.

Как уже указывалось, переход золь — гель осуществляется при повышении концентрации полимера выше некоторого предела или при условиях, при которых снижается растворимость и снижаются величины электростатических зарядов, создающих отталкивание. Это облегчает образование ковалентных связей между аминными и карбоксильными группами или взаимодействие и образование сшивки вандерваальсовскими силами.

Физико-химические механизмы авторегулирования на клеточном уровне являются основой, на которой строятся уже сложные схемы авторегулирования функций высших организмов.

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ И МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ПОСТОЯННЫЕ

Число Авогадро N	$6 \cdot 10^{23}$ *г·моль*$^{-1}$
Постоянная Больцмана k	$1{,}38 \cdot 10^{-16}$ *эрг/град*
Универсальная газовая постоянная R	$8{,}3 \cdot 10$ *эрг/г·моль·град*
Число Фарадея F	96 500 *к·г/экв*
Скорость света c	$3 \cdot 10^{10}$ *см/сек*
Масса атома водорода	$1{,}67 \cdot 10^{-24}$ *г*
Постоянная Планка h	$6{,}62 \cdot 10^{-27}$ *эрг·сек*
Масса электрона m	$9{,}1 \cdot 10^{-28}$ *г*
Заряд электрона e	$4{,}8 \cdot 10^{-10}$ *СГСЕ*
Энергия электрона, прошедшего разность потенциалов 1 *в* (1 *эв*)	$1{,}6 \cdot 10^{-12}$ *эрг*
Энергия, эквивалентная 1 калории при $+15^\circ$ С	4,18 *дж*
Единица активности — *кюри*	$3{,}7 \cdot 10^{10}$ *расп/сек*
Энергия, соответствующая молю квантов — 1 эйнштейн (для $\lambda = 400$ *ммк*)	73 *ккал·моль*
Энергия кванта (для $\lambda = 400$ *ммк*)	3,1 *эв*
Основание натурального логарифма — e	2,71828...
Число «пи» — π	3,14159...
Переводной множитель между десятичными и натуральными логарифмами (ln 10)	2,3
Мера длины 1 ангстрем (1 Å)	$1 \cdot 10^{-8}$ *см*
Мера длины 1 миллимикрон (1 *ммк*) = 1 нанометр (1 *нм*)	$1 \cdot 10^{-7}$ *см*

ЛИТЕРАТУРА

Основная

Аккерман Ю. Биофизика. М., «Мир», 1964.

Байер В. Биофизика. М., ИЛ, 1962.

Биофизические методы исследования (под ред. Ф. Юбера). М., ИЛ, 1956.

Булл Г. Б. Физическая биохимия. М., ИЛ, 1949.

Бурлакова Е. В., Владимиров Ю. А., Кольс О. Р., Кригер Ю. А., Кудряшов Ю. Б., Литвин Ф. Ф., Хомазюк В. Г. Малый практикум по биофизике. М., «Высшая школа», 1964.

Гизе А. Физиология клетки. М., ИЛ, 1959.

Живая клетка. Сборник статей, пер. с англ. Под ред. Г. М. Франка. М., ИЛ, 1962.

Пасынский А. Г. Биофизическая химия. М., «Высшая школа», 1963.

Практикум по общей биофизике. Под общ. ред. Б. Н. Тарусова, вып. 1—8, М., «Советская наука» и «Высшая школа», 1958—1964.

Рубинштейн Д. Л. Общая физиология. М., Медгиз, 1947.

Сетлоу Р., Поллард Э. Молекулярная биофизика. М., «Мир», 1964.

Современные проблемы биофизики, тт. 1 и 2 (пер. с англ.). Под ред. Г. М. Франка и А. Г. Пасынского. М., ИЛ, 1961.

Стейси Р., Уильямс Д., Уорден Р., Мак-Моррис Р. Основы биологической и медицинской физики. М., ИЛ, 1959.

Тарусов Б. Н. Основы биофизики и биофизической химии. М., «Высшая школа», 1960.

Физика и химия жизни. Сборник статей, перевод с английского. М., ИЛ, 1960.

Дополнительная

Введение. Биофизика, ее задачи и проблемы

Лазарев П. П. Биофизика в России и в СССР. Соч., т. 2, М., Изд-во АН СССР, 1950.

Лазарев П. П. Современные проблемы биофизики. Соч., т. 2. М., 1950.

Тарусов Б. Н. Биофизика и ее задачи. Журн. «Научные доклады высшей школы», № 4, 1965.

К главе I Термодинамика биологических систем

Брей Дж., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. М., ИЛ, 1959.

Денбиг К. Термодинамика необратимых стационарных процессов. М., ИЛ, 1954.

Пасынский А. Г. Теория открытых систем и ее применение в биохимии. Журн. «Успехи современной биологии», т. 43, № 3, 1957.

Пригожин И. Введение в термодинамику необратимых процессов. М., ИЛ, 1960.

К главе II. Кинетика биологических реакций

Брей Дж., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. М., ИЛ, 1959.

Семенов Н. Н. О некоторых проблемах химической кинетики и реакционной способности (свободные радикалы и цепные реакции). Изд. 2-е. М., Изд-во АН СССР, 1958.

Эмануэль Н. М., Кнорре Г. Курс химической кинетики. М., «Высшая школа», 1962.

К главе III. Свободно-радикальные процессы в биологических системах

Инграм Д. Электронный парамагнитный резонанс в свободных радикалах. М., ИЛ, 1961.

Кондратьев В. Н., Розанцев Э. Г. Свободные радикалы. Сб. «Новое в химии». М., «Наука», 1964. Свободные радикалы в биологических системах. Сборник под ред. Блуа. М., ИЛ, 1963.

К главе IV. Полимерная природа протоплазмы

Алов И. А. и др. Очерки функциональной морфологии клетки. М., Изд-во «Медицина», 1966.

Каргин В. А. Современные проблемы науки о полимерах. М., 1963.

Лимаренко И. М. Физико-химические свойства протоплазмы. М., Изд-во МГУ, 1966.

Структура и функции клетки. Сборник статей, пер. с англ. Под ред. Г. М. Франка. М., «Мир», 1964.

Химические основы процессов жизнедеятельности. Под ред. В. Н. Ореховича. М., Медгиз, 1962.

К главе V. Проницаемость клеток и тканей

Никольский Н. Н. Проницаемость клеток. Руководство по цитологии, т. I, М., «Наука», 1964.

Проблема проницаемости. Тр. конфер. Моск. об-ва физиологов, биохимиков и фармакологов, 1936. М., Медгиз, 1939.

Сабинин Д. А. Физиологические основы питания растений. М., Изд-во АН СССР, 1955.

Сатклифф Дж. Ф. Поглощение минеральных солей растениями. М., «Мир», 1964.

Трошин А. С. Проблема клеточной проницаемости. М., Изд-во АН СССР, 1956.

К главе VI. Электропроводность биологических систем

Седунов Б. И., Франк-Каменецкий Д. А. Диэлектрическая проницаемость биологических объектов. Журн. «Успехи физических наук», т. 79, в. 4, 1963.

Тарусов Б. Н. Электропроводность как метод определения жизнеспособности тканей. Журн. «Архив биологических наук», т. 52, 1938.

Ш в а н Г. Спектроскопия биологических веществ в поле переменного тока. Сб. «Электроника и кибернетика в биологии и медицине». М., ИЛ, 1963.

К главе VII. Физико-химические основы возбуждения

Введенский Н. Е. Возбуждение, торможение и наркоз. Избр. произв., ч. 2. Изд-во АН СССР, 1951.

Лазарев П. П. Ионная теория возбуждения живых тканей. Сочинения, т. 2. М. — Л. Изд-во АН СССР, 1950.

Молекулярная биология. Сборник статей, пер. с англ. М., ИЛ, 1963.

Насонов Д. Л. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. М., Изд-во АН СССР, 1959.

Унгар Д. Роль белковой структуры и адсорбции ионов в механизме возбуждения клетки. Журн. «Цитология», т. 1, № 6, 1959.

К главе VIII. Биоэлектрические потенциалы

Тасаки И. Проведение нервного импульса. М., ИЛ, 1957.

Ходжкин А. Нервный импульс. М., «Мир», 1965.

Экклс Дж. Физиология нервных клеток. М., ИЛ, 1959.

К главе IX. Электрокинетические явления

Глесстон С. Курс электрохимии. М., ИЛ, 1952.

Кригер Ю. А., Кудряшов Ю. Б. Электрокинетические явления в биологии. М., Изд-во МГУ, 1960.

К главе X. Мышечное сокращение

Гейльбрун Л. Динамика живой протоплазмы. М., ИЛ, 1957.

Камия Н. Движение протоплазмы. М., ИЛ, 1962.

Молекулярная биология. Сборник статей, перевод с английского. М., ИЛ, 1963.

Поглазов Б. Ф. Структура и функции сократительных белков. М., «Наука», 1965.

Сент-Джиордьи А. О мышечной деятельности. М., Медгиз, 1947.

К главе XI. Биофизические механизмы фотосинтеза и других фотобиологических процессов

Биохимия и биофизика фотосинтеза. М., «Наука», 1965.

Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М., «Наука», 1965.

Владимиров Ю. А. Сверхслабое свечение при биологических реакциях. М., «Наука», 1966.

Конев В. С. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск, Изд-во «Наука и техника», 1965.

Рид С. Возбужденные электронные состояния в химии и биологии. М., ИЛ, 1960.

Структура и функция фотокинетического аппарата. Сборник статей. М. ИЛ, 1962.

Теренин А. Н. Фотохимия красителей и родственных органических соединений. Изд-во АН СССР, 1947.

К главе XII. Ионизирующие излучения

Аглинцев К. К., Кодюков В. М., Лызлов А. Ф., Сивинцев Ю. В. Прикладная дозиметрия. М., Госатомиздат, 1962.

Бак З., Александер П. Основы радиобиологии. М., ИЛ, 1963.

Гродзенский Д. Э. Радиобиология. Изд. 2-е М., Госатомиздат, 1963.

Тарусов Б. Н. Основы биологического действия радиоактивных излучений. М., Медгиз, 1954.

Тарусов Б. Н. Первичные процессы лучевого поражения. М., Госатомиздат, 1962.

Циммер К. Г. Проблемы количественной радиобиологии. М., Госатомиздат, 1962.

К главе XIII. Клеточное деление

Биологическое воспроизведение макромолекул. Сборник статей. М., ИЛ, 1960.

Браше Ж. Биохимическая цитология. М., ИЛ, 1960.

Мирский А., Осава С. Интерфазное ядро. Сборник «Функциональная морфология клетки». М., ИЛ, 1963.

Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М., ИЛ, 1963.

К главе XIV. Авторегулирование

Тарусов Б. Н., Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. Сверхслабое свечение биологических систем. М., Изд-во МГУ, 1966.

Регуляция клеточного обмена. Сборник статей. М., ИЛ, 1962.

Регуляторные механизмы клетки. Под ред. И. Б. Збарского. М., «Мир», 1964.

СОДЕРЖАНИЕ

Борис Николаевич Тарусов, Валерий Федорович Антонов,
Елена Владимировна Бурлакова, Константин Семенович Бурдин,
Юрий Павлович Козлов, Ольга Романовна Кольс,
Юрий Аркадьевич Кригер, Юрий Борисович Кудряшов,
Грегор Альфредович Курелла, Феликс Федорович Литвин,
Тофик Гусейн-оглы Мамедов, Инна Михайловна Пархоменко,
Юрий Михайлович Петрусевич, Людмила Георгиевна Яглова

БИОФИЗИКА

Редактор *О. В. Макарова*
Художник *А. В. Алексеев*
Художественный редактор *Э. В. Марков*
Технический редактор *Э. М. Чижевский*
Корректор *З. Г. Карабанова*

Т-14018. Сдано в набор 25/I-68 г. Подп. к печати 12/IX-68 г.
Формат 60 × 90$^{1}/_{16}$. Объем 29,25 печ. л. Уч.-изд. л. 28,74.
Цена 1 р. 19 к. Изд. № Е-114. Тираж 25.000 экз. Зак. № 99

Тематический план издательства «Высшая школа»
(вузы и техникумы) на 1968 г. Позиция № 142
Москва, К-51, Неглинная ул., д. 29/14
Издательство «Высшая школа»

Московская типография № 16 Главполиграфпрома
Комитета по печати при Совете Министров СССР
Москва, Трехпрудный пер., 9